



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DOS
BIOMARCADORES DE DOENÇAS HUMANAS 7-METIL-GUANOSINA,
ORTO-TIROSINA E 3-NITRO-TIROSINA**

RAPHAEL FONSECA DO NASCIMENTO

Recife

Dezembro/2019

RAPHAEL FONSECA DO NASCIMENTO

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DOS
BIOMARCADORES DE DOENÇAS HUMANAS 7-METIL-GUANOSINA,
ORTO-TIROSINA E 3-NITRO-TIROSINA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira

Recife

Dezembro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N244e do Nascimento, Raphael Fonseca
Estudo eletroquímico e eletroanalítico dos biomarcadores de doenças humanas 7-metil-guanosina, orto
tirosina e 3-nitro-tirosina / Raphael Fonseca do Nascimento. - 2019.
120 f. : il.
- Orientador: Severino Carlos Bezerra de Oliveira.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Química, Recife, 2020.
1. 7-metilguanosina. 2. 3-nitro-tirosina. 3. biomarcadores de doenças humanas. 4. mecanismos redox. I.
Oliveira, Severino Carlos Bezerra de, orient. II. Título

RAPHAEL FONSECA DO NASCIMENTO

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DOS
BIOMARCADORES DE DOENÇAS HUMANAS 7-METIL-GUANOSINA,
ORTO-TIROSINA E 3-NITRO-TIROSINA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Aprovada em: 20/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira (DQ/UFRPE)
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Navarro (DQF/UFPE)
1º Examinador- externo

Prof. Dr. Williane Farias Ribeiro (DEMA/UFPB)
2º Examinador - externo

Prof. Dr. Claudio Augusto Gomes da Camara (DQ/UFRPE)
3º Examinador - interno

Prof. Dr. Alex Souza Moraes (DQ/UFRPE)
4º Examinador - interno



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as mulheres da minha vida, Júlia Fonseca (filha), Juliana Moura (esposa), Maria Axiliadora (mãe) e Auta Rodrigues (avó).



AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela garantia do amanhã.

Agradeço a minha mãe, **Maria Auxiliadora** e ao meu Irmão **Jehan Fonseca** pela paciência, dedicação e torcida em todos os momentos.

Aos meus familiares, **Célio Fábio, Marleide Moura, Paulo Célio, Lais Monteiro e Micheline Sedycias** pelo carinho e por estarem sempre disponíveis no que foi preciso.

À minha **filha Júlia** pelos sorrisos de todas as manhãs.

À minha **esposa Juliana**, pelo eterno amor, dedicação e carinho.

Ao meu **sobrinho Jehan Victor** – “...*tua trela é o teu tesouro...*”

Ao meu tio, **Alcides Fonseca** (*in memoriam*).

Ao meu orientador **Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira** pelos conselhos, ensinamentos e amizade, que por sua vez contribuíram de forma significativa para a minha formação profissional.

Ao **Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento** pela sua contribuição na minha formação, de forma significativa, desde a graduação e mestrado.

A todos do **Laboratório de Eletroanalítica e Bioeletroquímica (LEB)**, em especial, **Nathalia, Carlos Mendes, Maysa, Alex e José Ailton** e aos que já não se encontram, **Gabriel e Hitala** por todos os momentos de alegria, compartilhamento de conhecimento e de um ótimo ambiente de trabalho.

Ao LEB, pelo apoio instrumental.

Ao CNPQ e a FACEPE pelo o apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.



SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| RESUMO..... | IX |
| ABSTRACT..... | X |
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE TABELAS | XIV |
| LISTA DE QUADROS..... | XV |
| LISTA DE ESQUEMAS | XVI |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XVII |
| <i>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....</i> | 18 |
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Ácidos nucleicos..... | 20 |
| 1.1.1 Estrutura primária..... | 21 |
| 1.1.2 DNA: Estrutura secundária do DNA/dupla fita..... | 23 |
| 1.1.3 RNA: Tipos e estruturas..... | 24 |
| 1.1.4 Funções biológicas dos ácidos nucleicos | 24 |
| 1.1.5 Metilação dos ácidos nucleicos..... | 25 |
| 1.2 Aminoácidos: estrutura, características e funções..... | 27 |
| 1.2.1 Danos oxidativos em aminoácidos..... | 31 |
| 1.2.2 Determinação analítica dos derivados da tirosina: 3-nitro-, <i>orto</i> - e <i>para</i> -tirosina | 33 |
| 1.2.2.1 3-nitro-Tirosina..... | 33 |
| 1.2.2.2 <i>orto</i> -Tirosina..... | 34 |
| 1.2.2.3 <i>para</i> -Tirosina..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3 Princípios da voltametria | 35 |
| 1.3.1 Voltametria cíclica | 37 |
| 1.3.2 Voltametria de pulso diferencial | 38 |
| 1.3.3 Voltametria de onda quadrada | 40 |
| 1.3.4. Estudos voltamétricos de moléculas biológicas: ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas | 41 |
| 1.3.5. Estudos voltamétricos de ácidos nucleicos e seus componentes | 41 |
| 1.3.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica | 45 |
| CAPÍTULO 2. OBJETIVOS | 48 |
| 2.1. Objetivo geral | 50 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 50 |
| CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL | 51 |
| 3.1. Reagentes, materiais e metodologia | 52 |
| 3.2. Parâmetros voltamétricos e célula eletroquímica | 53 |
| 3.3. Aquisição e apresentação de dados voltamétricos | 55 |
| CAPÍTULO 4. 7-METILGUANOSINA: MECANISMO DE OXIDAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ELETROANALÍTICA | 56 |
| 4.1. Estudo eletroquímico e eletroanalítico do biomarcador 7-metil- guanosina | 57 |
| 4.2 Resultados e discussão..... | 57 |
| 4.2.1 Mecanismo de oxidação da 7-metil-guanosina | 57 |
| 4.2.1.1 Voltametria Cíclica | 57 |
| 4.2.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial | 59 |
| 4.2.1.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica | 62 |
| 4.2.2 Detecção eletroquímica da 7-metil-guanosina | 67 |
| 4.2.3 Estudo de possíveis interferentes na detecção eletroanalítica da 7-mGuo | 68 |

| | |
|---|------------|
| CAPÍTULO 5. REAÇÕES REDOX DOS BIOMARCADORES ORTO-TIROSINA E 3-NITRO-TIROSINA: UM ESTUDO COMPARATIVO COM A PARA-TIROSINA | 74 |
| 5.1. Mecanismo redox da <i>para</i>-tirosina, <i>orto</i>-tirosina e da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo: um estudo comparativo..... | 75 |
| 5.2 Resultados e discussão..... | 75 |
| 5.2.1 Mecanismo de oxidação da <i>p</i> -Tyr | 75 |
| 5.2.2 Mecanismo de oxidação da <i>o</i> -Tyr | 77 |
| 5.2.2.1 Voltametria Cíclica | 77 |
| 5.2.2.2 Voltametria de Pulso Diferencial | 80 |
| 5.2.2.3 Voltametria de Onda Quadrada | 83 |
| 5.2.2.4 Mecanismo de Oxidação da <i>orto</i> -Tirosina | 84 |
| 5.2.3 Mecanismo redox da 3-nitro-tirosina | 86 |
| 5.2.3.1 Mecanismo de Oxidação da 3-nitro-Tirosina | 87 |
| 5.2.3.1.1 Voltametria Cíclica..... | 87 |
| 5.2.3.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial..... | 89 |
| 5.2.3.1.3 Voltametria de Onda Quadrada..... | 93 |
| 5.2.3.1.4 Proposta de Mecanismo de Oxidação para a 3-nitro-Tirosina..... | 94 |
| 5.2.4 Detecção eletroquímica da 3-nitro-tirosina..... | 96 |
| 5.3.4.1 Redução | 97 |
| 5.3.4.1.1 Voltametria Cíclica..... | 97 |
| CONCLUSÕES..... | 102 |
| REFERÊNCIAS..... | 104 |
| PRODUÇÃO | 119 |



RESUMO

Danos oxidativos em moléculas biológicas, como no DNA de dupla hélice (dsDNA) e proteínas, estão associados com inúmeras patologias no organismo, tais como câncer. Assim é de grande relevância investigar os mecanismos redox que ocorrem *in-vivo* para diferentes processos biológicos. O presente trabalho tem como objetivo principal investigar o comportamento redox dos biomarcadores de doenças humanas, a 7-metil-guanosina (7-mGuo), *orto*-tirosina (*o*-Tyr) e 3-nitro-tirosina (3-NO₂-Tyr) em eletrodo de carbono vítreo (GCE), utilizando técnicas voltamétricas, como voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), bem como espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Os resultados eletroquímicos da *o*-Tyr e da 3-NO₂-Tyr também foram comparados aos da *para*-tirosina (*p*-Tyr). Metodologias eletroanalíticas para detecção e quantificação dessas espécies também foram investigadas e desenvolvidas na ausência e na presença de possíveis interferentes. A oxidação da 7-mGuo no GCE ocorre em uma única etapa irreversível dependente do pH, com a transferência de um elétron e um próton com a formação de produtos poliméricos que adsorvem fortemente na superfície do eletrodo. Um mecanismo da oxidação da 7-mGuo foi proposto a partir da análise dos resultados. Um método eletroanalítico para quantificação da 7-mGuo em pH fisiológico, utilizando GCE e DPV foi proposto, com um limite de detecção de 3,26 μmol L⁻¹ e limite de quantificação de 10,88 μmol L⁻¹. A detecção eletroquímica da 7-mGuo também foi investigada na presença dos potenciais interferentes, guanina, guanosina e 7-metilguanina (7-mGua). O estudo demonstrou que o pico anódico da 7-mGuo não sofreu nenhuma interferência dessas espécies, uma vez que sua oxidação ocorre em um potencial bastante distinto. Em geral, a *p*- e *o*-Tyr sofrem oxidação em uma única etapa irreversível, dependente do pH, com a transferência de um elétron e um próton, do grupo fenólico para a formação do radical fenóxi (Tyr[•]). No entanto, enquanto o radical da *p*-Tyr[•] polimeriza preferencialmente, formando um filme resistivo na superfície do GCE, o da *o*-Tyr[•] reage preferencialmente com água com a formação de derivados de *o*- e *p*-quinonas. Em relação a 3-NO₂-Tyr, sua oxidação ocorre em duas etapas consecutivas irreversíveis. A primeira etapa é dependente do pH, enquanto a segunda é independente, indicando a ausência de prótons no processo. O primeiro processo corresponde à oxidação do grupo fenólico para formação do radical intermediário 3-NO₂-Tyr[•], o qual pode reagir em meio aquoso de diferentes maneiras, polimerizando, formando um filme resistivo na superfície do GCE e / ou sendo diretamente eletro-oxidado a um produto catiônico (segunda etapa). Os dados voltamétricos também mostraram que o grupo fenol da 3-NO₂-Tyr é mais difícil de oxidar quando comparado às moléculas da *p*- e da *o*-Tyr. Além disso, diferentemente da *p*-Tyr e *o*-Tyr que não apresentam picos catódicos, a 3-NO₂-Tyr sofre eletroredução em meio ácido em uma única etapa irreversível com a formação de dois produtos eletroativos. Tais processos foram atribuídos à redução do grupo nitro para formação da hidroxilamina e amina. Assim, é claramente demonstrado que a posição do grupo fenólico na molécula da Tyr, bem como a presença do grupo nitro, influenciam fortemente suas propriedades redox. O mecanismo redox da *o*-Tyr e da 3-NO₂-Tyr são apresentados e discutidos. Um método voltamétrico para detecção e quantificação da 3-NO₂-Tyr em meio neutro utilizando DPV foi também proposto e na faixa de concentração de 20 a 200 μmol L⁻¹, apresentou um coeficiente de correlação de 0,998 e um limite de detecção de 6,21 μmol L⁻¹. O conhecimento dos mecanismos redox dessas espécies investigadas, 7-mGuo, *o*-Tyr e 3-NO₂-Tyr, assim como os métodos eletroanalíticos propostos para suas quantificações se correlacionam e são importantes para literatura, como conhecimentos básicos para futuras interpretações e aplicações na bioquímica molecular.

Palavras-chave: 7-metilguanossina, 3-nitro-tirosina, biomarcadores de doenças humanas, mecanismos redox.

ABSTRACT

Oxidative damage in biological molecules, such as double-stranded DNA (dsDNA) and proteins are associated with numerous pathologies in the human body, such as cancer. Thus, it is of great relevance to investigate the redox mechanisms that occur *in vivo* for different biological processes. The present study aims to investigate the redox behavior of the biomarkers of human diseases, 7-methyl-guanosine (7-mGuo), *ortho*-tyrosina (*o*-Tyr) and 3-nitro-tyrosine (3-NO₂-Tyr) on glassy carbon electrode (GCE) using voltammetric techniques, such as cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV), differential pulse voltammetry (DPV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The electrochemical results of *o*-Tyr and 3-NO₂-Tyr were also compared with the *para*-tyrosine (*p*-Tyr). Electroanalytical methodologies for the detection and quantification of these species were also investigated and developed in the absence and presence of possible interferences. Oxidation of the 7-mGuo on GCE occurs in single step pH-dependent irreversible pathway with the transfer of one electron and one proton with formation of polymer products absorbing on the electrode surface. An oxidation mechanism of 7-mGuo has been proposed. An electroanalytical method for quantification of 7-mGuo at physiological pH, using GCE and DPV was proposed, with a detection limit of 3.26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and limit of quantification of 10,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Electrochemical detection of 7-mGuo was also investigated in the presence of potential interference of guanine, guanosine and 7-methylguanine (7-mGua). The study showed that the anodic peak of 7-mGuo suffered no interference of these species, since oxidation occurs in a very different potential. In general, the *p*- and *o*-Tyr undergo oxidation in a single irreversible step pH-dependent, with the transfer of one electron and one proton, from the phenolic group to formation of Tyr phenoxy radical (Tyr[•]). However, while the *p*-Tyr[•] radical preferably polymerizes, forming a resistive film on the GCE surface, the *o*-Tyr[•] reacts preferentially with water with formation of *o*- and *p*-quinone derivatives, that are adsorbed and reversibly reduced on the GCE surface. In relation the 3-NO₂-Tyr its oxidation occurs, in general, in two irreversible steps. The first step is pH-dependent, while the second is pH-independent, indicating the absence of protons in the process. The first process correspond to the oxidation of the phenolic group to form 3-NO₂-Tyr[•], which reacts in different ways, polymerizing, forming a resistive film on the GCE surface and/or being directly electro-oxidized to a cationic product (second step). The voltammetric data also showed that the 3-NO₂-Tyr phenol group is more difficult to oxidize when compared to *p*- and *o*-Tyr molecules. Moreover, unlike *p*-Tyr and *o*-Tyr that present no cathodic peak, 3-NO₂-Tyr suffers in acid medium electro-reduction in a single irreversible step with formation of two electroactive products. Such processes were assigned to the reduction of the nitro group to form hydroxylamine and amine. Thus, is clearly demonstrated that the nitro group attached, as well as the phenolic group position at the Tyr molecule, strongly influence its redox properties. The redox mechanism of *o*-Tyr and 3-NO₂-Tyr are presented and discussed. A voltammetric method for detection and quantification of 3-NO₂-Tyr in physiological medium using DPV was also proposed and a concentration range of 20 to 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, presented a correlation coefficient of 0.998 and a detection limit of 6, 21 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The knowledge of redox mechanisms of the biomarkers of human diseases, 7-mGuo, *o*-Tyr and 3-NO₂-Tyr, as well as the proposed electroanalytical methods for their quantification correlates and are important in the literature, as basic knowledge to future interpretation and applications in molecular biochemistry.

Keywords: 7-methylguanosine, *ortho*-tyrosine, 3-nitrotyrosine, biomarkers of human diseases, redox mechanisms.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura primária de uma molécula de DNA..... | 21 |
| Figura 2. Estruturas das bases do DNA e RNA, nucleosídeo e nucleotídeo..... | 22 |
| Figura 3. Modelo da estrutura do DNA de fita dupla (esquerda). Interação entre os pares de bases timina-adenina e citosina-guanina (direita)..... | 23 |
| Figura 4. Adutos metilados da guanina..... | 26 |
| Figura 5. Estrutura geral dos aminoácidos..... | 27 |
| Figura 6. Produtos da oxidação dos resíduos de: (A) histidina, (B) lisina, (C) arginina e (D) prolina..... | 32 |
| Figura 7. Reações de conversão da fenilalanina em <i>para</i> -, <i>orto</i> - e <i>meta</i> -tirosina..... | 32 |
| Figura 8. Modificações causadas por RNS na tirosina..... | 33 |
| Figura 9. (A) sinal de excitação para um sistema redox em uma voltametria cíclica e (B) exemplo de um sistema irreversível..... | 37 |
| Figura 10. Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo (A) para a DPV em sistemas digitais e sinal resposta (B) | 39 |
| Figura 11. Esquema de aplicação de potenciais (A) e resposta típica da SWV (B) | 40 |
| Figura 12. Gráfico de impedância no plano complexo de um sistema eletroquímico..... | 46 |
| Figura 13. Imagem do potenciostato..... | 54 |
| Figura 14. Imagem da célula eletroquímica e dos eletrodos utilizados..... | 54 |
| Figura 15. CVs sucessivos da 7-mGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato, pH = 4,4 e (B) tampão fosfato, pH = 7,2. (—) Primeira varredura, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (C) CVs da 7-mGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7,2, sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 50, 100, 250, 500 e 1000 mV s^{-1})..... | 58 |
| Figura 16. DPVs sucessivos (com correção da linha de base) da 7-mGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato, pH 4,4 e (B) tampão fosfato, pH = 7,2. (—) Primeira varredura, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ | 59 |
| Figura 17. (A) gráfico 3D de DPVs (com correção da linha de base) da 7-MeGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ vs. pH. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráficos de $(\blacksquare) I_{pa}$ e $(\square) E_{pa}$ vs. pH..... | 61 |
| Figura 18. EIS da 7-mGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para diferentes potenciais (A) pH = 4,4 e (C) pH = 7,2. EIS sucessivos da 7-mGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (B) aplicando o potencial fixo de 1,22 V em pH = 4,4 e (D) aplicando um potencial de 1,08 V em pH = 7,2..... | 62 |
| Figura 19. EIS da 7-mGua 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para diferentes potenciais (A) pH = 4,4 e (C) pH = 7,2. EIS sucessivos da 7-mGua 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (B) aplicando o potencial fixo de 0,94 V em pH = 4,4 e (D) aplicando um potencial de 0,88 V em pH = 7,2..... | 65 |
| Figura 20. (A) DPVs (com correção da linha de base) de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 7-mGuo e (B) Curva analítica em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7,2, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ | 68 |
| Figura 21. DPVs (com correção de linha de base) da Gua 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 7-mGua 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Guo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 7-mGuo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato pH = 4,4 e (C) em tampão fosfato pH = 7,2. DPVs da mistura Gua 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + 7-mGua 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + | |

| | |
|---|----|
| Guo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + 7-mGuo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (B) tampão acetato pH = 4,4 e (D) em tampão fosfato pH = 7,2..... | 70 |
| Figura 22. DPVs (com correção de linha de base) das misturas da 7-mGua 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em (A) tampão acetato pH = 4,4 e (B) em tampão fosfato pH = 7,2. DPVs (com correção de linha de base) das misturas da 7-mGuo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em (C) tampão acetato pH = 4,4 e (D) em tampão fosfato pH = 7,2. DPV da solução de dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ controle (----)..... | 71 |
| Figura 23. DPVs do (—) dsDNA 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ controle e do (—) dsDNA 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + (a) 20, (b) 40 e (c) 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 7-mGuo. Tampão fosfato, pH = 7,2, $v = 5\text{mV s}^{-1}$ | 72 |
| Figura 24. Sucessivos voltamogramas CV, DP e SW de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ p-Tyr em tampão acetato (A, C e E) , pH = 4,5 e (B, D e F) tampão fosfato, pH = 7,0. (A-D) Primeiro e (E-F) segunda varredura (—). I_t - corrente total, (—) I_f - corrente contínua e (—) I_b - corrente reversa. CV e SWV a 50 mV s^{-1} e DPV a 5 mV s^{-1} | 76 |
| Figura 25 CVs sucessivos de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o-Tyr em (A) tampão acetato, pH = 4,4 e (B) tampão fosfato, pH = 7,2. (—) Primeiro registrado, $v = 50\text{mV s}^{-1}$. (C) CVs de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o-Tyr em tampão fosfato, pH = 7,2 sob diferentes taxas de varredura (10, 20, 50, 100, 250, 500 e 1000 mV s^{-1})..... | 78 |
| Figura 26. Voltamogramas de DP sucessivos de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o-Tyr em tampão acetato, pH = 4,5. (—) Primeira varredura, $v = 5\text{mVs}^{-1}$ | 81 |
| Figura 27. (A) gráfico 3D de voltamogramas DP de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o-Tyr versus pH, $v = 5\text{mV s}^{-1}$. (B) Parcela de E_{pa} vs. pH..... | 82 |
| Figura 28. SWVs de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 3-NO ₂ -Tyr em pH = 7,2. (A) Primeira varredura e (B) segunda varredura. (—), I_t - corrente total, (—) I_f corrente direta e (—) I_b - corrente reversa, $v = 50\text{mV s}^{-1}$ | 83 |
| Figura 29. CVs sucessivos da 3-NO ₂ -Tyr 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7,2, saturada com N ₂ , (A) Varredura direção catódica e (B) Varredura direção anódica, (—) primeira varredura..... | 86 |
| Figura 30. CVs sucessivos da 3-NO ₂ -Tyr 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato, pH = 4,5 e (B) tampão fosfato, pH 7,0. (—) Primeira varredura, $v = 50\text{mV s}^{-1}$ | 88 |
| Figura 31. CVs da 3-NO ₂ -Tyr 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7,0, sob diferentes velocidades de varredura (a) 20, (b) 30, (c) 50, (d) 150 e (e) 300 mV s^{-1} | 89 |
| Figura 32. Varreduras sucessivas de DP (com correção de linha de base) da 3-NO ₂ -Tyr 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (A e C) tampão acetato pH = 4,5, (B e D) tampão fosfato pH = 7,0, em diferentes janelas de potenciais. (—) primeira varredura de potencial. $v = 5\text{mV s}^{-1}$ | 90 |
| Figura 33. (A) DPVs em 3D (com correção de linha de base) da 3-NO ₂ -Tyr 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ vs. pH. (B) Gráfico do E_{pa} vs. pH, (■) E_{p2a} do pico 1a, (□) E_{p2a} do pico 2a..... | 91 |
| Figura 34. SWVs de 3-NO ₂ -Tyr 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (A e C) tampão acetato pH = 4,5 e (B e D) fosfato pH = 7,2. (—) Primeira varredura e I_t - corrente total, (—) I_f - corrente direta e (—) I_b - corrente reversa, $v_{ef} = 50\text{mV s}^{-1}$ | 93 |

- Figura 35. (A)** DPVs (com correção da linha de base) da de 7-mGuo 20,0, 40,0, 60,0, 80,0, 100,0 e 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e **(B)** Curva analítica da 7-mGuo correspondente², $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 96
- Figura 36.** Voltamogramas cíclicos de 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 3-NO₂-Tyr em tampão acetato, pH = 4,4, saturado com N₂. **(A)** Varreduras sucessivas, (—) Primeira varredura, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e **(B)** sob diferentes taxas de varredura (20, 30, 50, 150 e 300 mV s^{-1}).98
- Figura 37.** Espectros de impedância no plano complexo em diferentes potenciais aplicados para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **(A e B)** p-Tyr, **(C e D)** o-Tyr e **(E e F)** 3-NO₂-Tyr. Espectros de impedância consecutivos em **(A)** + 0,83 V, **(B)** + 0,68 V, **(C)** +0,77 V, **(D)** + 0,66 V, **(E)** + 0,94 V e **(F)** + 0,86 V. **(A, C e E)** em tampão acetato, pH = 4,4 e **(A, C e E)** em tampão fosfato, pH = 7,2. (○) Primeira varredura.100



LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Composição das soluções de eletrólito suporte. | 53 |
| Tabela 2. Parâmetros de ajuste dos dados de impedância para 7-mGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na superfície do GCE. | 64 |
| Tabela 3. Parâmetros de ajuste dos dados de impedância para 7-mGua 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na superfície do GCE. | 66 |
| Tabela 4. Potenciais de oxidação/redução da <i>p</i> -Tyr, <i>o</i> -Tyr and 3-NO ₂ -Tyr na CV em GCE. | 79 |
| Tabela 5. Dados de impedância em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 4,5 e em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 7,2. | 101 |



LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Estruturas químicas dos aminoácidos apolares (hidrofóbicos), (—) cadeia lateral..... | 28 |
| Quadro 2. Estruturas químicas dos aminoácidos polares neutros, (—) cadeia lateral. | 29 |
| Quadro 3. Estruturas químicas dos aminoácidos polares (ácidos), (—) cadeia lateral. | 29 |
| Quadro 4. Estruturas químicas dos aminoácidos polares (básicos), em pH = 7,0, (—) cadeia lateral. | 30 |
| Quadro 5. Potenciais de oxidação do DNA, bases livres e da 8-oxoguanine, em DPV, sob eletrodo de carbono vítreo | 42 |
| Quadro 6. Potenciais de oxidação dos aminoácidos eletroativos em GCE, pH = 7,0. | 44 |



LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Proposta de mecanismo de oxidação eletroquímica de 7-mGuo..... | 67 |
| Esquema 2. Mecanismo de oxidação proposto para o-Tyr..... | 85 |
| Esquema 3. Mecanismo de oxidação da 3-NO ₂ -Tyr proposto..... | 95 |



LISTA DE ABREVIATURAS

3-NO₂-Tyr – 3-nitro-tirosina

7-mGua – 7-metil-guanina

7-mGuo – 7-metil-guanosina

Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata / cloreto de prata

CV – Voltametria cíclica (do inglês “*Cyclic Voltammetry*”)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “*Deoxyribonuclei Acid*”)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês “*Differential Pulse Voltammetry*”)

dsDNA – DNA dupla fita (do inglês “*Double Stranded DNA*”)

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”)

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “*Glassy Carbon Electrode*”)

Gua – Guanina

Guo – Guanosina

I_b – Corrente reversa (do inglês “*Backward Current*”)

I_f – Corrente direta (do inglês “*Forward Current*”)

I_t – Corrente total (do inglês “*Total Current*”)

o-Tyr – *orto*-Tirosina

p-Tyr – *para*-Tirosina

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês “*Ribonucleic Acid*”)

RNS – Espécies reativas de nitrogênio (do inglês “*Reactive Nitrogen Species*”)

ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês “*Reactive Oxygen Species*”)

SPGE – Eletrodo impresso de carbono vítreo (do inglês “*Screening Printed Electrode*”)

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês “*Square Wave Voltammetry*”)

Tyr – Tirosina



CAPÍTULO 1 - Introdução

1. INTRODUÇÃO

Agentes alquilantes são espécies que podem reagir *in-vivo* diretamente com o DNA e moléculas de RNA, produzindo uma variedade de adutos, como 7-metilguanina (7-mGua), 7-metildeoxiguanosina (7-mdGuo), 7-metilguanina (7-mGuo), 8-oxo-7-metilguanina (8-oxo-7-mGua), 5-metilcitosina, 3-metiladenosina, o-6-metilguanina e outros (BROTONS et al., 2015a; DO NASCIMENTO et al., 2018; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2012; REYNAUD et al., 1992; SONG et al., 2013), alterando suas funções normais e causando várias doenças, como câncer, hipertensão, distúrbios psiquiátricos e doença de Alzheimer (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; DEGAN; MONTESANO; WILD, 1988; DO NASCIMENTO et al., 2018; KRSTULJA et al., 2014; NIOT-MANSART; MUHAMED; ARNOULD, 2015; PARK; AMES, 1988; THOMAS et al., 2013). Foi relatado que entre os vários adutos de ácidos nucleicos metilados, a espécie predominante é a 7-mGua, devido à alta reatividade da guanina na posição N7 (DEGAN; MONTESANO; WILD, 1988; DO NASCIMENTO et al., 2018; NIOT-MANSART; MUHAMED; ARNOULD, 2015). Assim, a alquilação dos ácidos nucleicos tem sido alvo de muitas pesquisas na área de bioquímica e química analítica.

Espécies altamente reativas de oxigênio (ROS) e espécies de nitrogênio (RNS) são naturalmente produzidas no corpo a partir do metabolismo celular, bem como por agentes externos. No organismo, em concentrações muito baixas, essas espécies exercem vários papéis importantes, como produção de energia, fagocitose e regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de importantes substâncias biológicas. No entanto, o excesso dessas espécies reativas pode causar danos oxidativos em moléculas biológicas importantes, DNA e proteínas, com conseqüências diretas em muitos processos patológicos (SEELEY et al., 2014).

No organismo, o ânion altamente reativo peroxinitrito (ONOO^-) pode, por exemplo, interagir com resíduos de tirosina nas proteínas, gerando 3-nitro-tirosina (3- NO_2 -Tyr) (HENSLEY et al., 1998; PENNATHUR et al., 1999; SARVER et al., 2001; TOPKAYA et al., 2018; ZHAN; WANG; DESIDERIO, 2015), A geração de 3-

NO₂-Tyr tem sido associada a diferentes tipos de doenças, como lesão pulmonar aguda, neurodegeneração, aterosclerose e alguns tipos de câncer (ZHAN; WANG; DESIDERIO, 2015) (HENSLEY et al., 1998; PENNATHUR et al., 1999; SARVER et al., 2001; TOPKAYA et al., 2018). Por outro lado, a produção de *orto*-tiosina (*o*-Tyr), está associada a danos oxidativos causados nas proteínas por ROS, como o radical hidroxila (DU et al., 2004; IPSON; FISHER, 2016; PENNATHUR et al., 1999). O aumento da concentração de *o*-Tyr *in vivo* tem sido associado a doenças, como diabetes, aterosclerose, artrite reumatóide, câncer e outras (DU et al., 2004; IPSON; FISHER, 2016). Técnicas eletroquímicas, como as voltamétricas e a espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizando diferentes substratos eletroquímicos, especificamente eletrodos sólidos de carbono, ouro e platina, são atualmente empregadas em estudos de caracterização redox de compostos biológicos importantes (QUEIROZ et al., 2018). Eletrodos a base de carbono, como carbono vítreo, grafite pirolítico altamente orientado e de diamante dopado com boro, por possuírem inúmeras vantagens como as janelas de potenciais positivas e negativas mais estendidas entre todos os eletrodos sólidos conhecidos na atualidade, são hoje considerados os mais apropriados para estudos anódicos e catódicos (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; CARLOS et al., 2013; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; QUEIROZ et al., 2018). Entretanto, nenhum estudo eletroquímico em meio aquoso, numa larga faixa de pH, utilizando GCE e técnicas eletroquímicas, voltamétricas e EIS, para os biomarcadores de doenças humanas, 7-mGuo, *o*-Tyr e a 3-NO₂-Tyr foram apresentados na literatura até o momento.

Técnicas voltamétricas de pulso, como voltametria de pulso diferencial (DPV) e de onda quadrada (SWV), possuem alto grau de sensibilidade e seletividade e por isso têm se destacado no desenvolvimento de novas metodologias analíticas (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017).

O presente trabalho é dedicado ao estudo eletroquímico e eletroanalítico dos biomarcadores de doenças humanas 7-mGuo, *o*-Tyr e a 3-NO₂-Tyr, utilizando GCE e técnicas eletroquímicas como CV, DPV, SWV e EIS, e por sua vez insere-se no contexto de desenvolvimento e de sensores eletroquímicos para detecção e quantificação de danos nos ácidos nucleicos, via processos de alquilações, mais diretamente em resíduos de guanina, bem como danos oxidativos em proteínas, mais especificamente em resíduos de tiosina. Os resultados estão apresentados no capítulo 4 e 5.

No capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados referentes ao estudo do biomarcador 7-mGuo. A investigação foi dividida em várias etapas. Na primeira investigou-se o comportamento anódico da 7-mGuo em GCE utilizando técnicas voltamétricas (CV e DPV) e EIS, com o objetivo principal de postular o seu mecanismo de oxidação. Na segunda investigou-se e desenvolveu-se um método eletroanalítico para detecção e quantificação da 7-mGuo utilizando DPV em meio fisiológico (pH = 7,2). Foi também investigada a quantificação da 7-mGuo na presença de possíveis interferentes, tais como guanina (Gua), 7-mGua e guanossina (Guo). Os resultados demonstraram ótima seletividade na detecção da 7-mGuo na presença de todos os interferentes uma vez que seu potencial de oxidação ocorre em valores mais positivos.

O capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados dos estudos eletroquímicos referentes aos biomarcadores de estresse oxidativo *o*-Tyr e 3-NO₂-Tyr, os quais também foram comparados com os dados eletroquímicos investigados, nas mesmas condições experimentais, da *p*-Tyr. Os mecanismos redox desses biomarcadores foram propostos e comparados, bem como suas potencialidades para as aplicações eletroanalíticas dessas espécies foram demonstradas.

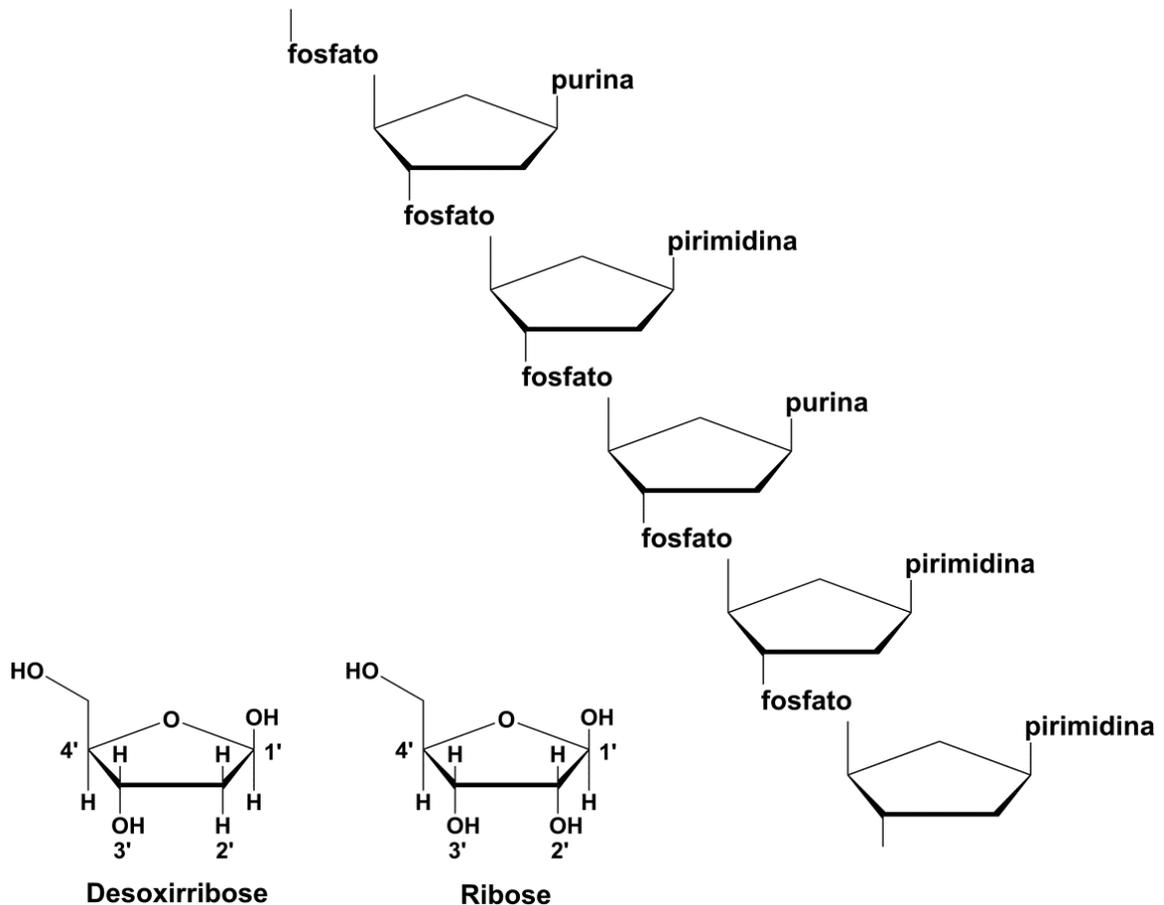
1.1 Ácidos nucleicos

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um tipo de ácido nucleico responsável por carregar a informação genética de uma geração de célula para outra e na produção de proteínas (mecanismo celular denominado de transcrição genética). A transcrição genética inicia-se com a síntese do ácido ribonucleico (RNA) transportador, o qual tem a função de carregar informações do DNA até uma região da célula onde serão utilizadas na síntese proteica. Os ácidos nucleicos, DNA e o RNA, são macromoléculas poliméricas o qual as unidades de repetição são moléculas de açúcar ligadas por ligações fosfato (ATKINS; LORETTA, 2012; CAMPBELL; FARRELL, 2007; MAHAN, 1972). As estruturas, as funções biológicas, bem como os possíveis danos estruturais causados nos ácidos nucleicos *in-vivo*, por diferentes espécies químicas, serão discutidos detalhadamente nesta seção.

1.1.1 Estrutura primária

Os ácidos nucleicos no geral são macromoléculas biológicas poliméricas constituídas por monômeros de nucleotídeos, **Figura 1**.

Figura 1. Estrutura primária dos ácidos nucleicos.

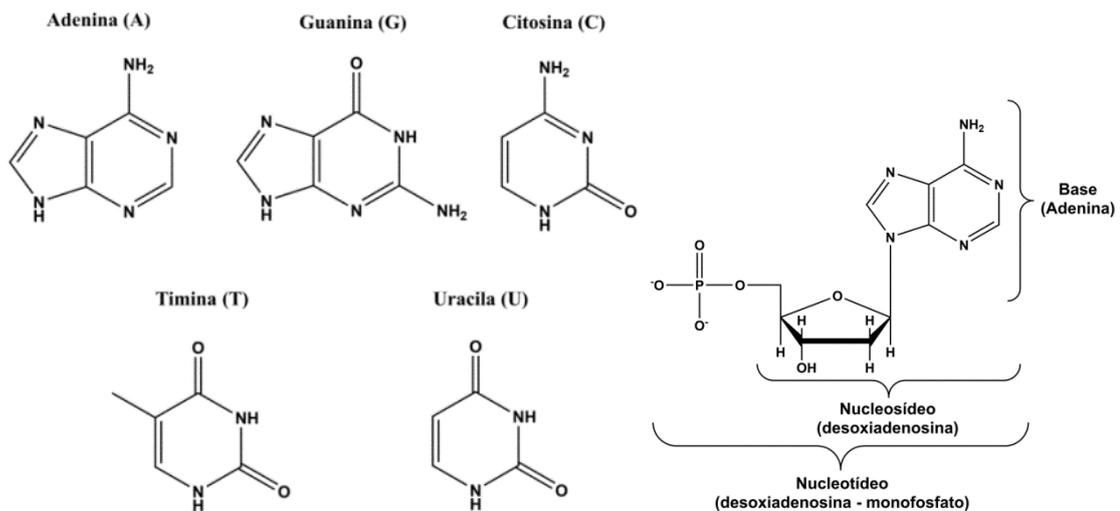


Fonte adaptada: (MAHAN, 1972).

Esses nucleotídeos são formados por três espécies químicas ligadas covalentemente, são elas; uma base nitrogenada, um açúcar e um grupo fosfato, **Figura 1** (ATKINS; LORETTA, 2012; CAMPBELL; FARRELL, 2007; MAHAN, 1972). No RNA o açúcar encontrado é a ribose enquanto que na estrutura do DNA o açúcar constituinte é a desoxirribose, **Figura 1**, e essas espécies são bem similares, distintas apenas em relação ao carbono 2', uma vez que na desoxirribose possui dois hidrogênios e na ribose um hidrogênio e um grupo hidroxila.

O DNA e o RNA possuem bases que são classificadas como purínicas e pirimidínicas. As purínicas são caracterizadas por possuírem anéis aromáticos condensados tais como a adenina e guanina, essas espécies estão presentes nas estruturas do DNA e RNA. Por outro lado, as bases pirimidínicas são substâncias aromáticas de um único anel, exemplos dessas moléculas são a citosina, timina (encontrada apenas no DNA) e uracila (ocorrência apenas no RNA). A **Figura 2** apresenta as bases pirimidínicas, uracila (2,4-dioxopirimidina), timina (5-metil-2,4-dioxopirimidina) e a citosina (4-amino-2-oxopirimidina). As purinas são a adenina (6-aminopurina) e guanina (2-amino-6-oxopurina). As bases quando associadas a uma molécula de açúcar recebe a denominação de nucleosídeo e quando associadas a uma molécula de açúcar e fosfato recebe a denominação de nucleotídeo (FASMAN; COMPANYY, 1977; NELSON, 2014).

Figura 2. Estruturas das bases do DNA e RNA, nucleosídeo e nucleotídeo.

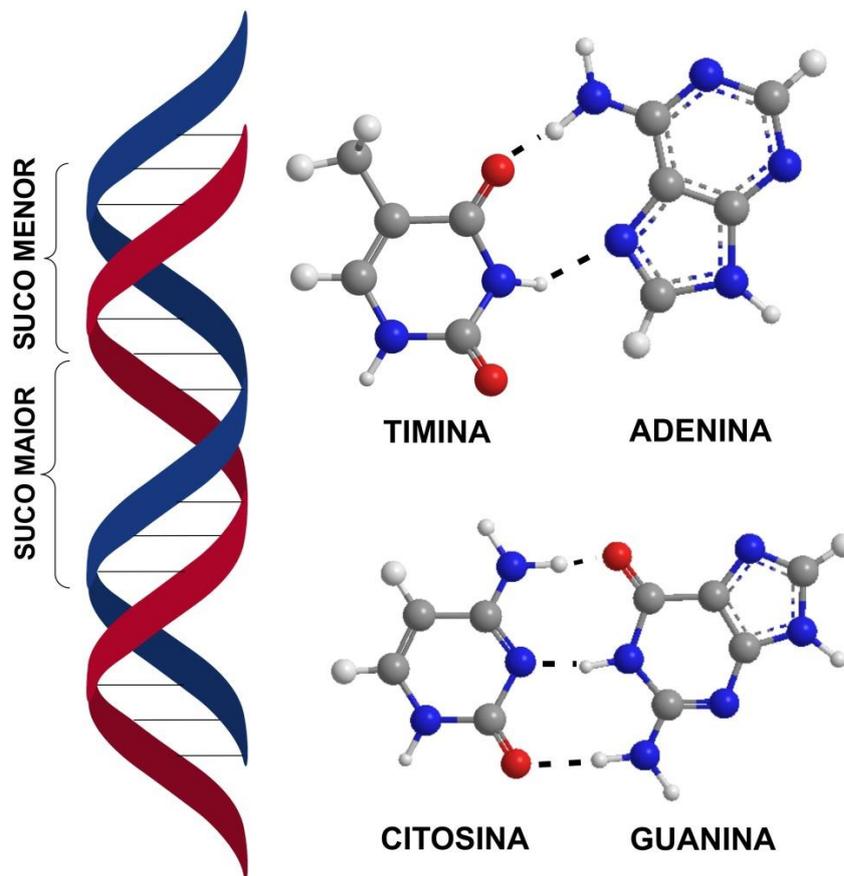


A ligação feita pelo carbono 1' do açúcar ao nitrogênio 1 das pirimidinas ou ao nitrogênio 9 das purinas através de uma ligação covalente chamada β -glicosídica ocorre para formar os nucleosídeos. (CAMPBELL; FARRELL, 2007; NELSON, 2014). Já os nucleotídeos são ésteres fosfóricos dos nucleosídeos, **Figura 2**.

1.1.2 DNA: Estrutura secundária do DNA/dupla fita

A molécula do DNA tem a característica espacial de uma fita dupla (dsDNA) também denominada de estrutura secundária, na qual duas longas cadeias de polinucleotídeos ajustam-se em virtude das inúmeras ligações de hidrogênio que formam entre as bases ligadas as duas fitas, como apresentado na **Figura 3**. Essas interações entre as bases entre as fitas opostas estabelecem o alinhamento da hélice, com os pares de base em planos perpendiculares ao eixo e as moléculas de desoxirribose e fosfato na parte externa da dupla fita, **Figura 3**. (ATKINS; LORETTA, 2012; CAMPBELL; FARRELL, 2007).

Figura 3. Modelo da estrutura do DNA de fita dupla (esquerda). Interação entre os pares de bases timina-adenina e citosina-guanina (direita).



Fonte adaptada: (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

Investigações envolvendo simulações de modelos moleculares para determinar como essas bases interagem evidenciaram que a estrutura da timina está ligada a estrutura da adenina por meio de duas ligações de hidrogênio que por sua vez formam o par **A-T**. O mesmo fenômeno foi observado para a interação entre as bases guanina e citosina são complementares, contudo a associação dessas bases ocorre através de três ligações de hidrogênio para formar o par **G-C**, **Figura 3** (FASMAN; COMPANY, 1977; NELSON, 2014). Como resultado, as voltas da hélice, são regulares e consistentes (ATKINS; LORETTA, 2012; CAMPBELL; FARRELL, 2007). As moléculas do DNA geralmente são enormes com inúmeros nucleotídeos, mesmo em bactérias (ATKINS; LORETTA, 2012; CAMPBELL; FARRELL, 2007).

1.1.3 RNA: Tipos e estruturas

O RNA apresenta diferenças estruturais bem significativas quando comparado ao DNA, por exemplo ocorre geralmente em fita simples que pode estar enrolada, entretanto as relações molares dos pares de bases não são regulares. Além disso, existem diferentes tipos de RNAs com papéis importantes e distintos em diferentes processos celulares, tais como: RNA transportador (tRNA), responsável por transportar os aminoácidos individuais até os locais da síntese da proteína; RNA mensageiro (mRNA), estabelece as sequências dos aminoácidos nas proteínas e o RNA ribossômico (rRNA), combina com as proteínas para formar ribossomos (CAMPBELL; FARRELL, 2007; MAHAN, 1972).

1.1.4 Funções biológicas dos ácidos nucleicos

A macromolécula do DNA *in-vivo* tem duas importantes funções, a replicação celular e a síntese de proteínas. A replicação é o processo de duplicação do DNA, necessário para produzir novas células filhas. A capacidade de replicação da molécula de DNA está associada diretamente com a sua estrutura de dupla fita, principalmente, como já relatado devido ao emparelhamento específico das bases complementares **AT** e **GC**. Na replicação as ligações de hidrogênio são quebradas formando duas cadeias separadas de polinucleotídeos, parcialmente ou totalmente, o qual serão as matrizes para ligações de desoxiribonucleícos livres em



configurações complementares, produzindo conseqüentemente duas novas moléculas de DNA exatamente iguais a original. Já a síntese de proteínas ocorre via dois processos denominados de transcrição e a tradução. Na transcrição ocorre a formação do RNA a partir do DNA, já a tradução é o mecanismo que estabelece a seqüência dos aminoácidos na proteína, a partir da seqüência de bases do mRNA. Quase todos os organismos seguem este mecanismo genético de DNA-RNA (transcrição)-proteína (tradução). (CAMPBELL; FARRELL, 2007)

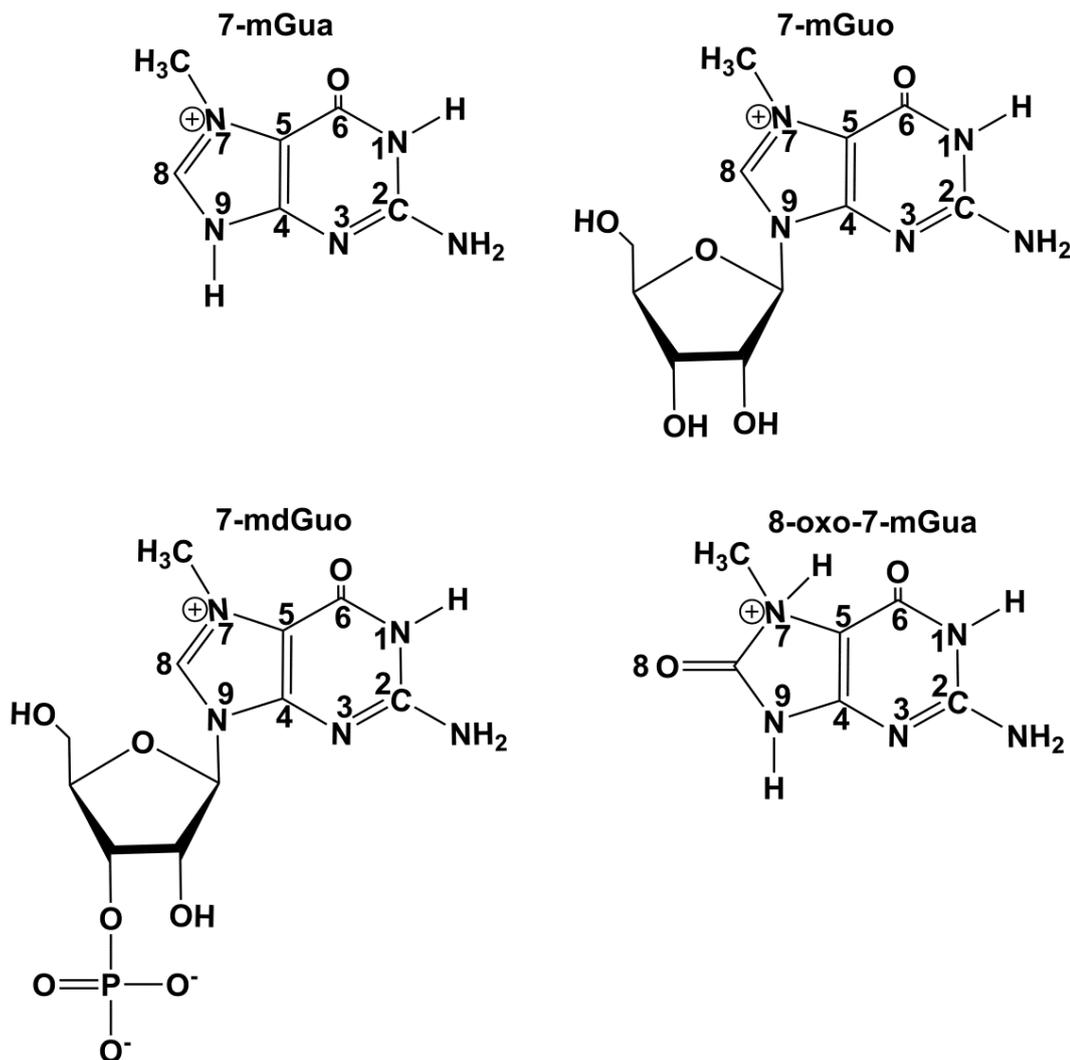
1.1.5 Metilação dos ácidos nucleicos

A metilação do DNA ocorre normalmente *in-vivo* a partir da adição do grupo metil, por enzimas denominadas de metiltransferases, em resíduos de citosina presentes em dinucleotídeos **GC** e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma. Os doadores do radical metil são a metionina, folato, colina e vitamina B12, todos esses obtidos apenas pela dieta humana (DO NASCIMENTO et al., 2018; ENROTH et al., 2019; FRANCIS et al., 2010; MONGAN; EMES; ARCHER, 2019). Entretanto metilações do DNA fora deste padrão como a possível causa de importantes doenças já foram identificadas e vários estudos vêm sendo realizados para a compreensão desses mecanismos (C. LOPES; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2013; DO NASCIMENTO et al., 2018; FRANCIS et al., 2010; HWANG et al., 2010; NIOT-MANSART; MUHAMEDI; ARNOULD, 2015)

Agentes alquilantes, como halogenetos de metila, dietil nitrosamina, 1,2-dimetil hidrazina e N-etil-N'-nitrosourea, são espécies que podem reagir diretamente com o DNA e moléculas de RNA alterando suas funções normais e causando várias doenças, como câncer, distúrbios psiquiátricos, doença de Alzheimer e hipertensão (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; DEGAN; MONTESANO; WILD, 1988; DO NASCIMENTO et al., 2018; KRSTULJA et al., 2014; NIOT-MANSART; MUHAMEDI; ARNOULD, 2015; PARK; AMES, 1988; THOMAS et al., 2013) Ácidos nucleicos são suscetíveis ao ataque de tais espécies químicas produzindo muitos adutos, como 7-mGua, 7-mdGuo, 7-mGuo, 8-oxo-7-mGua, 5-metilcitosina, 3-metiladenosina, o-6-metilguanossina e outros (BROTTONS et al., 2015a; DO NASCIMENTO et al., 2018; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2012; REYNAUD et al., 1992; SONG et al., 2013). Foi relatado que entre vários adutos de ácidos nucleicos metilados (padrões

anormais), a espécie predominante é a 7-mGua, devido à alta reatividade da guanina na posição N7 (DEGAN; MONTESANO; WILD, 1988; DO NASCIMENTO et al., 2018; NIOT-MANSART; MUHAMEDI; ARNOULD, 2015). Foi demonstrado que em humanos, por exemplo, a concentração de 7-mGua é maior em fumantes e aumentou na urina de ratos após a exposição desses animais a agentes de metilação (THOMAS et al., 2013). A presença de adutos de guanina N7 por exemplo, 7-mGua, 7-mdGuo, 7-mGuo e / ou 8-oxo-7- mGua, **Figura 4**, nas amostras de DNA e RNA podem ser associadas com alta exposição a agentes alquilantes endógenos e/ou exógenos (DEGAN; MONTESANO; WILD, 1988; EDA; KARA, 2014; NIOT-MANSART; MUHAMEDI; ARNOULD, 2015; RAFIQUE et al., 2013; SEQUARIS; REYNAUD, 1975; THOMAS et al., 2013).

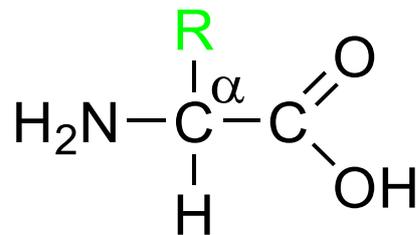
Figura 4. Adutos metilados da guanina.



1.2 Aminoácidos: estrutura, características e funções

As proteínas são macromoléculas poliméricas de aminoácidos e desempenham inúmeras funções, tais como constituem o material cromossômico e as membranas celulares, catalizadores de várias reações e transporte de oxigênio no sangue (CAMPBELL; FARRELL, 2007; HARVEY; FERREIER, 2012; NELSON, 2014). A estrutura geral dos aminoácidos tem um carbono central (carbono alfa, quase sempre quiral) ao qual se ligam quatro grupos: o grupo amina (NH_2), grupo carboxílico (COOH), hidrogênio e um substituinte característico de cadeia lateral denominado de R, **Figura 5**.

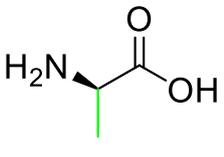
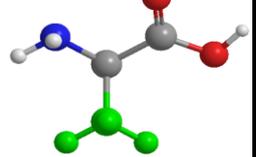
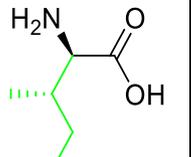
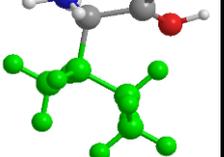
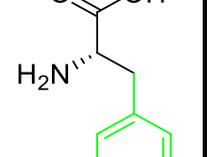
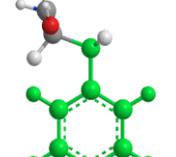
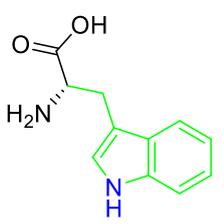
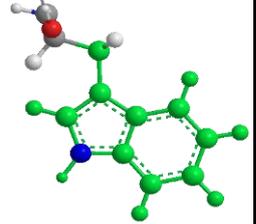
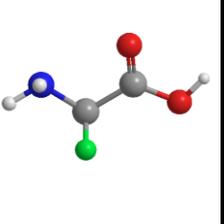
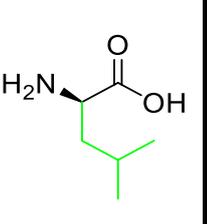
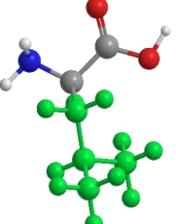
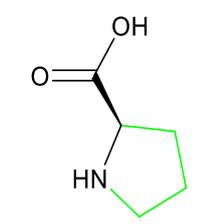
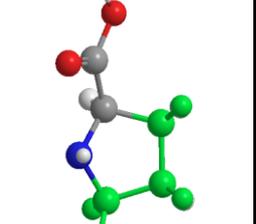
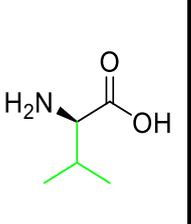
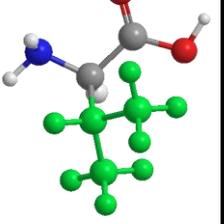
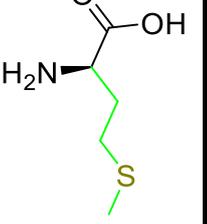
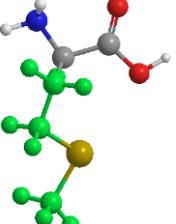
Figura 5. Estrutura geral dos aminoácidos



Dentre vários aminoácidos apenas 20 são encontrados nas proteínas e suas propriedades químicas são principalmente estabelecidas pela cadeia lateral **R**, como características polares ou apolares e presença de grupos funcionais ácidos ou básicos (CAMPBELL; FARRELL, 2007; HARVEY; FERREIER, 2012; NELSON, 2014). As fórmulas estruturais, nomes usuais e abreviações de três e uma letra para os 20 aminoácidos identificados em proteínas estão relatadas no **Quadros 1-4**.

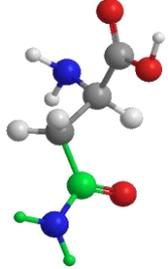
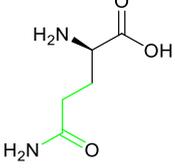
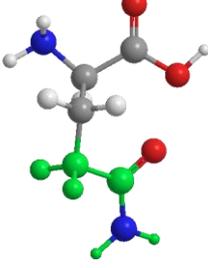
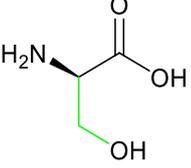
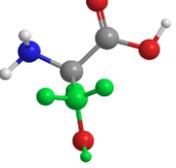
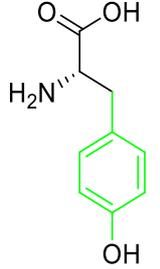
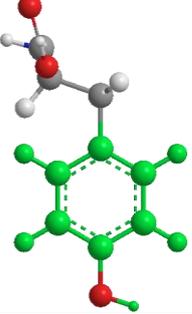
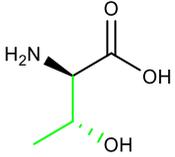
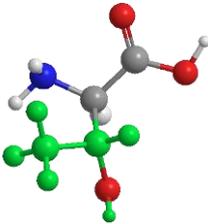
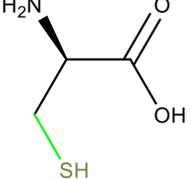
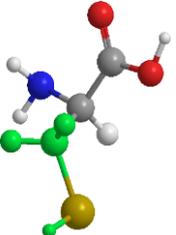
O **Quadro 1** apresenta o grupo de aminoácidos com cadeias laterais apolares não-carregadas (hidrofóbicos), o qual fazem parte a alanina, cisteína, glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptofano e a metionina (CAMPBELL; FARRELL, 2007; HARVEY; FERREIER, 2012; NELSON, 2014).

Quadro 1. Estruturas químicas dos aminoácidos apolares (hidrofóbicos), (—) cadeia lateral.

| Aminoácidos de cadeia lateral apolar não-carregada | | | | | |
|---|---|---|--|---|---|
| Alanina (Ala, A) | | Isoleucina (Ile, I) | | Fenilalanina (Phe, F) | |
|  |  |  |  |  |  |
| Triptofano (Trp, W) | | Glicina (Gly, G) | | Leucina (Leu, L) | |
|  |  |  |  |  |  |
| Prolina (Pro, P) | | Valina (Val, V) | | Metionina (Met, M) | |
|  |  |  |  |  |  |

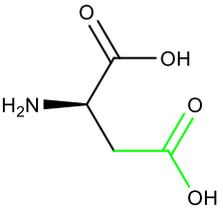
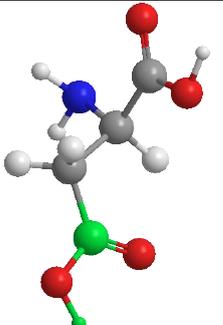
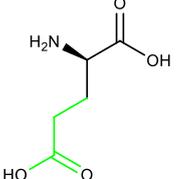
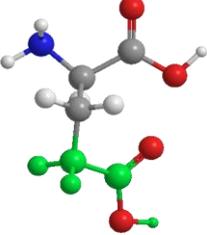
O grupo de aminoácidos que possuem cadeias laterais polares e que em pH = 7,0 são neutras, a serina, treonina, tirosina, glutamina, cisteína e a asparagina, está apresentado no **Quadro 2**. Por exemplo a tirosina possui um grupo fenólico com pka próximo de 10, podendo assim perder próton em uma titulação ácido-base (NELSON, 2014).

Quadro 2. Estruturas químicas dos aminoácidos polares neutros, (—) cadeia lateral.

| Aminoácidos de cadeia lateral polar neutro | | | | | |
|--|--|---|--|---|--|
| Asparagina (Asn, N) | | Glutamina (Gln, Q) | | Serina (Ser, S) | |
|  |  |  |  |  |  |
| Tirosina (Tyr, Y) | | Treonina (Thr, T) | | Cisteína (Cys, C) | |
|  |  |  |  |  |  |

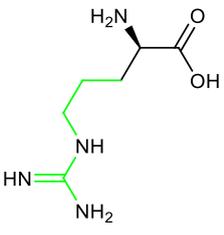
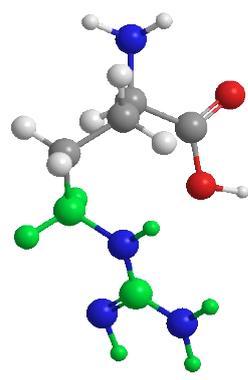
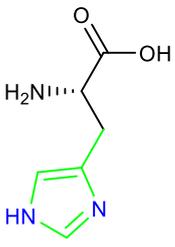
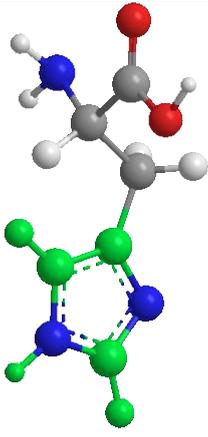
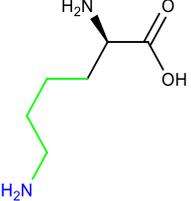
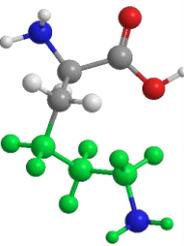
Dois aminoácidos, o ácido glutâmico e o ácido aspártico, possuem grupos carboxila em suas cadeias laterais, além dos presentes em todos os aminoácidos. Têm conseqüentemente cadeias laterais carregadas negativamente e são classificados como aminoácidos polares ácidos, **Quadro 3**, (CAMPBELL; FARRELL, 2007; HARVEY; FERREIER, 2012; NELSON, 2014).

Quadro 3. Estruturas químicas dos aminoácidos polares (ácidos), (—) cadeia lateral.

| Aminoácidos com cadeia lateral polar (ácido) | | | |
|---|---|--|---|
| Ácido Aspártico (Asp, D) | | Ácido Glutâmico (Glu, E) | |
|  |  |  |  |

Existem três aminoácidos, a arginina, histidina e a lisina, que possuem cadeias laterais básicas, o qual em pH = 7,0 estão na maioria carregados positivamente (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

Quadro 4. Estruturas químicas dos aminoácidos polares (básicos), (—) cadeia lateral.

| Aminoácidos com cadeia lateral polar (básico) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arginina (Arg, R) | | Histidina (His, H) | | Lisina (Lys, K) | |
|  |  |  |  |  |  |

Dessa forma, ficou demonstrado nos **Quadros 1-4** que todos os aminoácidos descritos, exceto a glicina, possuem quatro substituintes diferentes no carbono alfa, sendo conseqüentemente opticamente ativos. Entretanto, nas proteínas naturais só foram encontrados isômeros levogiros, isto é espécies que desviam a luz polarizada para a esquerda (CAMPBELL; FARRELL, 2007). Outra propriedade importante é que devido a presença do grupo amina e carboxila a forma iônica (catiônica ou aniônica) desses aminoácidos vai depender consideravelmente do pH do meio (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

As ligações entre aminoácidos denominam-se ligações peptídicas e estabelecem-se entre o carbono carbonílico e o nitrogênio amínico de dois aminoácidos diferentes, com a perda de uma molécula de água (CLAYDEN et al., 2000).

Uma cadeia de aminoácidos é chamada de "peptídeo", esta pode possuir dois aminoácidos (dipeptídeos), três aminoácidos (tripeptídeos), quatro aminoácidos (tetrapeptídeos), ou muitos aminoácidos (polipeptídeos). A classificação proteína é dado quando há entre centenas e milhares de aminoácidos na composição do polipeptídeo (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

A estrutura de uma proteína pode ser caracterizada em quatro níveis. A primária, é a sequência de resíduos de aminoácidos. A estrutura secundária a forma do esqueleto polipeptídico (como o esqueleto se enrola ou forma folhas). A estrutura terciária é como a estrutura secundária estará dobrada, devido principalmente as ligações entre os resíduos dos aminoácidos, por exemplo ligações dissulfeto entre aminoácidos que contém enxofre. Por último a estrutura quaternária ocorre devido a associação de proteínas individuais formando macromoléculas bem complexas e distintas. Cada um desses níveis estruturas são de extrema relevância para a correta função da proteína (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

1.2.1 Danos oxidativos em aminoácidos

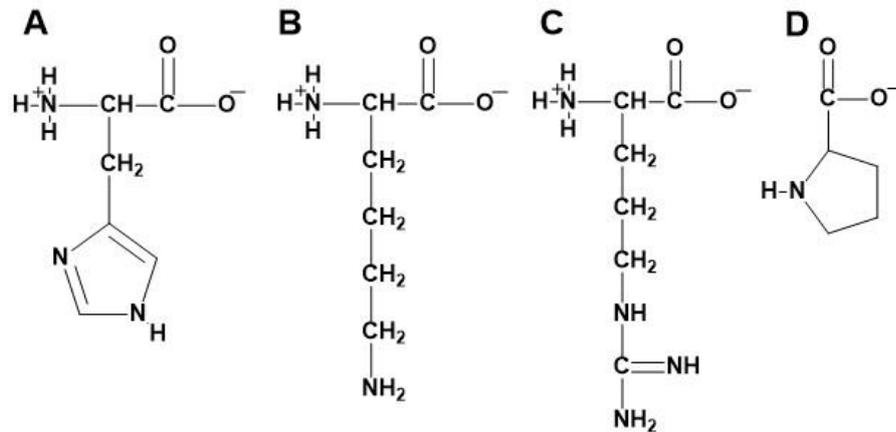
Devido à sua abundância em células as proteínas são alvos primários da oxidação *in-vivo*, por exemplo a oxidação de resíduos de aminoácidos por espécies altamente reativas, como as ROS ou RNS, geradas por inúmeras reações no interior das células (STADTMAN; LEVINE, 2003), causando geralmente modificações estruturais bem significativas (STADTMAN; LEVINE, 2003)

Danos em proteínas, provocados por meio da oxidação induzida por ROS e RNS, são atualmente já conhecidos por causarem doenças neurológicas degenerativas, pulmonares, inflamação, doenças cardiovasculares entre outros problemas (STADTMAN; LEVINE, 2003).

A oxidação das proteínas ocorre principalmente nas cadeias laterais dos aminoácidos. Resíduos de histidina podem ser facilmente oxidados à 2-oxohistidina, **Figura 6**. A oxidação dos aminoácidos de lisina, arginina e prolina levam à formação de derivados carbonílicos (CAMPBELL; FARRELL, 2007) . O aminoácido Phe *in-vivo* pode ser oxidado exclusivamente no C4, pela enzima fenilalanina hidroxilase, produzindo *para*-Tyr (*p*-Tyr), **Figura 7**.



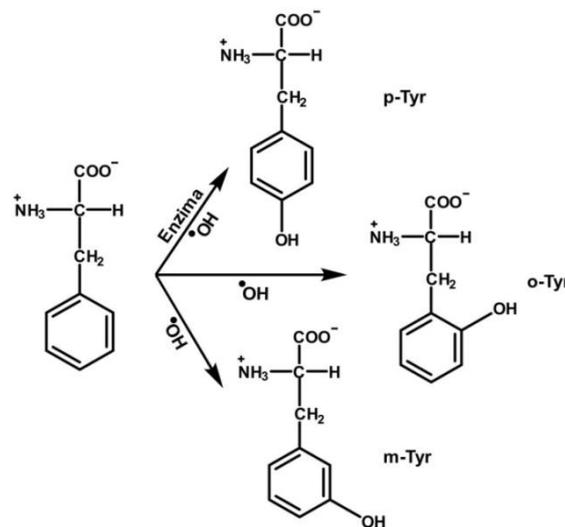
Figura 6. Estrutura dos aminoácidos: (A) histidina, (B) lisina, (C) arginina e (D) prolina.



Fonte: (CAMPBELL; FARRELL, 2007)

Entretanto, na presença de ROS, por exemplo radicais hidroxila, a Phe pode ser oxidada nas posições *para*, *meta* e *orto* produzindo respectivamente os isômeros *p*-, *m*- e *o*-Tyr, **Figura 7**. As elevações nas concentrações de *o*-Tyr livre e ligadas a proteínas foram observadas em muitas doenças nas quais se pensa que o estresse oxidativo desempenha um papel patológico, incluindo, entre outras, diabetes, formação de catarata e aterosclerose (IPSON; FISHER, 2016). Outro dano oxidativo já estabelecido em proteínas ocorre devido a presença de RNS, como o peroxinitrito (ONOO^-), que pode reagir com resíduos de tirosina no C3 do anel fenólico produzindo a 3- NO_2 -Tyr, **Figura 8**, (NASCIMENTO et al., 2019; TOPKAYA; CETIN; OTLES, 2018).

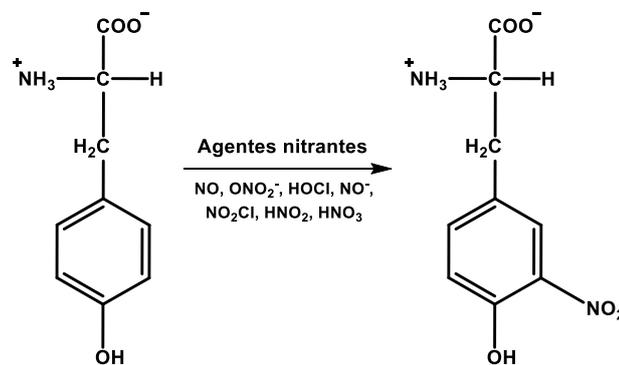
Figura 7. Reações de conversão da fenilalanina em *para*-, *orto*- e *meta*-tirosina.



Fonte: (IPSON; FISHER, 2016)

Essas modificações interferem nas propriedades físico-químicas do aminoácido, e quando esses derivados de tirsona estão participando da estrutura das proteínas podem ter importantes consequências funcionais (NASCIMENTO et al., 2019). Doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, esclerose lateral amiotrófica (ELA), esclerose múltipla, doença de Alzheimer e outras patologias inflamatórias podem estar associadas a esse tipo de modificação (DU et al., 2004).

Figura 8. Modificações causadas por RNS na tirosina.



Fonte: (AHSAN, 2013).

Devido às propriedades redox dos aminoácidos e de seus derivados, componentes das proteínas, o comportamento eletroquímico dessas espécies tem sido investigado nos últimos anos em diferentes substratos eletroquímicos, como eletrodos de ouro e carbono, utilizando técnicas voltamétricas (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011). Uma revisão bibliográfica mais detalhada do comportamento voltamétrico de aminoácidos é apresentada na seção 1.3.6.

1.2.2 Determinação analítica dos derivados da tirosina: 3-nitro-, *orto*- e *para*-tirosina

1.2.2.1 3-nitro-Tirosina

A 3-nitro-tirosina foi a primeira molécula a ser proposta como biomarcador de estresse nitrosativo (CROW; BECKMAN, 1995), assim uma série de métodos analíticos vêm sendo proposto na literatura para sua quantificação (TEIXEIRA et al., 2016).

Alguns métodos para detecção e quantificação da 3-NO₂-Tyr por cromatografia líquida de alta performance com detecção ultravioleta (HPLC-UV) foram propostos entretanto os limites de detecção não foram suficientes para análises em amostras reais (HENSLEY et al., 1998). HPLC com detecção eletroquímica (ECD) tem sido apresentada como uma alternativa que permite uma quantificação fácil, sensível e seletiva da 3-NO₂-Tyr (HENSLEY et al., 1999). A principal diferença entre o ECD e outras formas de detecção por HPLC é que o analito a ser analisado experimenta uma reação redox ao atingir o detector. A corrente gerada por essa reação depende da espécie e deve ser proporcional à sua concentração. Compostos fenólicos são bastante adequados para fins de detecção por ECD, pois são normalmente oxidados em diferentes substratos eletroquímicos como ouro, platina e carbono e em baixos potenciais (200–800 mV), bem como são bem retidos na fase reversa das colunas de HPLC (HENSLEY; WILLIAMSON; FLOYD, 2000). A espectrometria de massa também foi utilizada para detecção da 3-NO₂-Tyr (SALMAN-TABCHEH; GUÉRIN; TORREILLES, 1995).

Um ensaio Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), baseado em uma plataforma eletroquimioluminescente (ECL), foi recentemente proposto para detecção da 3-NO₂-Tyr. O método ECL usa uma corrente elétrica para produzir luminescência. A corrente elétrica é transmitida ao complexo anticorpo/antígeno através de eletrodos de carbono contidos na base da placa de ELISA (KNIGHT et al., 2018).

1.2.2.2 *orto*-Tirosina

Desde os anos 1990, a *orto*-tirosina tem sido caracterizada como um indicador de radicais hidroxila e estresse oxidativo, o que desencadeou o desenvolvimento de vários métodos para sua detecção, como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (HALLIWELL; KAUR, 1997; HEINECKE et al., 1999; KAUR; HALLIWELL, 1994; LI et al., 2003; REDDY et al., 1999).

A detecção da *o*-Tyr em proteínas foi realizada com precisão e em níveis baixos utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS). Este ensaio seria eficiente no processo de detecção por eliminar a interferência de fatores não proteicos (BLOUNT, 1997). Métodos analíticos baseados em ELISA se

apresentam como alternativas que minimizam algumas possíveis interferências (CAO; CUTLER, 1995).

PAL et al., 1988 propuseram um método de detecção e estimativa de o-Tyr em alimentos utilizando a fluorimetria, onde analisaram a absorção e a fluorescência da o-Tyr e verificaram bandas máximas de absorção e fluorescência em 270 nm e 305 nm, respectivamente, em meio ácido e neutro.

1.2.2.3 *para*-Tirosina

Diferentes métodos têm sido apresentados na literatura para detecção de p-Tyr, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (JIANG et al., 2010; YOU et al., 2003), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (ISHII et al., 2006), cromatografia de troca iônica (RAVIDRAN; BRYDEN, 2005), eletroforese capilar (UNDERBERG; WATER, 2002), fluorimetria (SIKORSKA et al., 2008) e quimioluminescência (COSTIN; FRANCIS; LEWIS, 2003; LIANG et al., 2005).

1.3 Princípios da voltametria

A voltametria é um conjunto de técnicas que podem ser utilizadas para obter informações qualitativas e quantitativas de espécies química eletroativas, a partir do registro de curvas potencial vs. corrente. Esses gráficos também conhecidos como voltamogramas são sinais respostas do processo de eletrólise das espécies químicas em uma célula eletroquímica que contém, pelo menos, dois eletrodos, um eletrodo de trabalho e outro de referência. As espécies eletroativas têm características termodinâmicas favoráveis para que ocorra os processos de oxidação e/ou redução (BARD; FAULKNER, 2001). Demais possibilidades de investigação são os fenômenos de transferência de cargas em solução (processo homogêneo) ou na superfície de eletrodos (processo heterogêneo), transferência de massa e velocidade de reação (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

Nas análises voltamétricas atuais e devido ao avanço a eletrônica, geralmente são utilizados um sistema de três eletrodos numa célula eletroquímica. Os três tipos são: o eletrodo de referência, o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho que são

imersos numa solução da amostra. O **eletrodo de trabalho**, também conhecido como eletrodo indicador, é o eletrodo onde ocorre a reação de transferência de elétrons do analito de interesse. O potencial deste eletrodo é controlado a partir do eletrodo de referência. O **eletrodo de referência** utilizado numa experiência eletroquímica deve possuir uma impedância elevada não permitindo passagem significativa de corrente por si próprio. Um **eletrodo auxiliar**, onde ocorre à reação complementar de transferência de elétrons, assegura que a corrente elétrica relativa ao processo redox como um todo migre entre ele e o eletrodo de trabalho, evitando que ocorram quaisquer mudanças no eletrodo de referência para que este mantenha seu potencial constante o tempo todo. Assim, nos estudos eletroquímicos dois componentes são de extrema importância, os eletrodos e o eletrólito suporte (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

Os eletrodos de trabalho atualmente mais utilizados são os substratos eletroquímicos sólidos, como superfícies de carbono, ouro e platina (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006). As superfícies de carbono existem em diferentes formatos, tais como, grafite, carbono vítreo, nanotubos, fibra de carbono, diamante e etc. O de eletrodo de carbono vítreo é um dos mais utilizados devido suas propriedades, uma delas e talvez a mais importante é a faixa de potencial mais alargada para valores de potenciais mais elevados anódicos quando comparados ao eletrodo de ouro, bem como o de platina. Além disso, necessita geralmente apenas de um polimento mecânico para a ativação da sua superfície, visto que exposto a atmosfera sua superfície é gradualmente desativada (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

O eletrólito é uma substância que, ao dissolver-se em um dado solvente, produz uma solução com uma alta condutividade elétrica e extremamente maior que a condutividade do solvente. Em um sistema eletroquímico é comum usar a denominação eletrólito suporte, o qual deve possuir uma concentração pelo menos cem vezes maior que a da espécie eletroativa (BARD; FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

A corrente resultante da oxidação ou redução da espécie eletroativa investigada é denominada de corrente faradaica, uma vez que obedece a lei de Faraday (1 mol da espécie eletroativa envolve $n \times 96487$ C), sendo uma medida direta da velocidade da reação. A corrente total é o somatório da corrente faradaica da espécie e da corrente capacitiva. A corrente capacitiva é relacionada com a

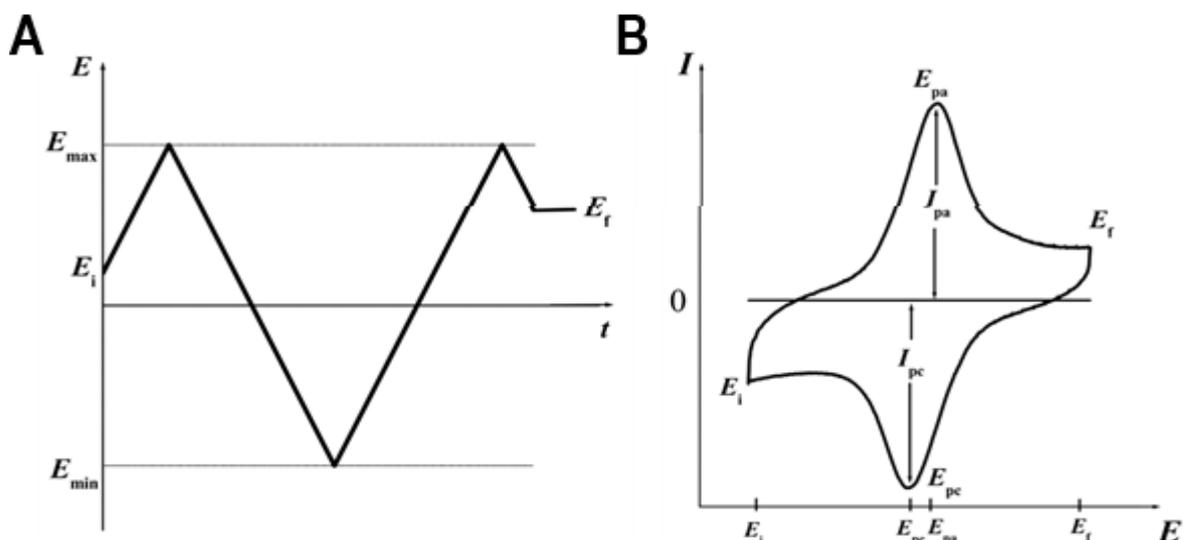
carga/descarga da capacitância de dupla camada, seria como um capacitor devido acúmulo ou remoção de cargas na superfície do eletrodo de trabalho e no eletrólito. Entretanto a corrente capacitiva não está relacionada a nenhum processo redox com transferência de carga (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

1.3.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma das técnicas voltamétricas que pode ser utilizada para caracterizar ou quantificar processos eletroquímicos. Essa técnica tem como características fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, cinética de reações heterogêneas de transferências de elétrons e investigar reações químicas acopladas a processos adsorptivos (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

A varredura de potencial na voltametria cíclica é aplicada linearmente no sentido direto ou no sentido inverso no eletrodo de trabalho em repouso e polarizado. A corrente é medida através das despolarizações resultantes das reações faradaicas (BARD; FAULKNER, 2001). O sinal de excitação (potencial vs. tempo) na CV é uma varredura de potencial linear na forma de uma onda triangular em função do tempo (**Figura 9A**).

Figura 9. (A) sinal de excitação para um sistema redox em uma voltametria cíclica e (B) exemplo de um sistema reversível



Fonte: (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993)

A **Figura 9B** apresenta o voltamograma cíclico de um sistema reversível. Nessa técnica, a diferença de potencial aplicada nos eletrodos varia de forma linear a uma velocidade de varredura constante $v = dE / dt$, entre um potencial inicial (E_i) e um potencial final (E_f) que por sua vez são parâmetros pré-estabelecidos. O sentido dessa varredura pode ser invertido quando atinge um valor de potencial máximo (E_{max}) e novamente invertido quando é atingido o potencial mínimo (E_{min}), dessa forma, estabelecendo uma variação cíclica de varredura de potencial (BARD; FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

Para um sistema irreversível controlado por difusão temos a equação de Randles-Sevcik (GUIDELLI et al., 2014a) **Equação 1**:

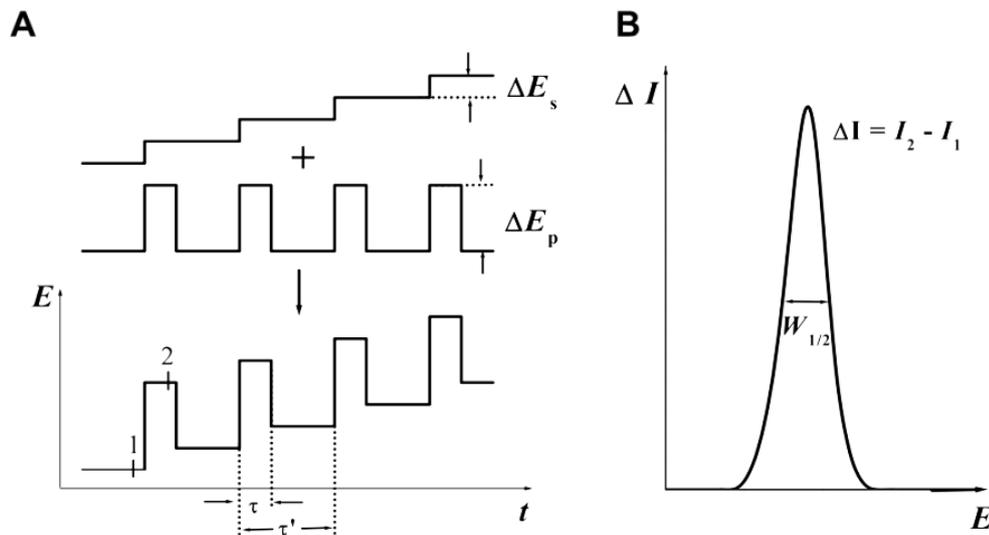
$$I_{pa} \text{ (A)} = 2.99 \times 10^5 n (\alpha_c + n^2)^{1/2} A C_o D_o^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

onde, I_{pa} é a corrente de pico anódico em ampére (**A**), n é o número de elétrons envolvidos no processo, α_c o coeficiente de transferência de carga, A é a área do eletrodo (cm^2), D_o é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, v é a velocidade de varredura em V s^{-1} e C_o é a concentração da espécie oxidada no seio da solução em mol cm^{-3} .

1.3.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (DPV) é resultante da combinação de duas variações de potencial. A sobreposição de uma rampa com variação linear acrescida de incrementos de potencial em degraus com variação ΔE_s , que por sua vez é combinada com variações pulsadas de amplitude ΔE_p em intervalos periódicos de tempo t fixos (**Figura 10A**). (BARD; FAULKNER, 2001)

Figura 10. Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo **(A)** para a DPV em sistemas digitais e sinal resposta **(B)**.



Fonte: (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993)

As técnicas de pulso voltamétricas, como DPV e a voltametria de onda quadrada (SWV), geralmente são de grande relevância experimental, considerando suas altas resoluções e sensibilidades, que permitem uma boa separação dos picos, para melhor caracterizar as etapas subsequentes.

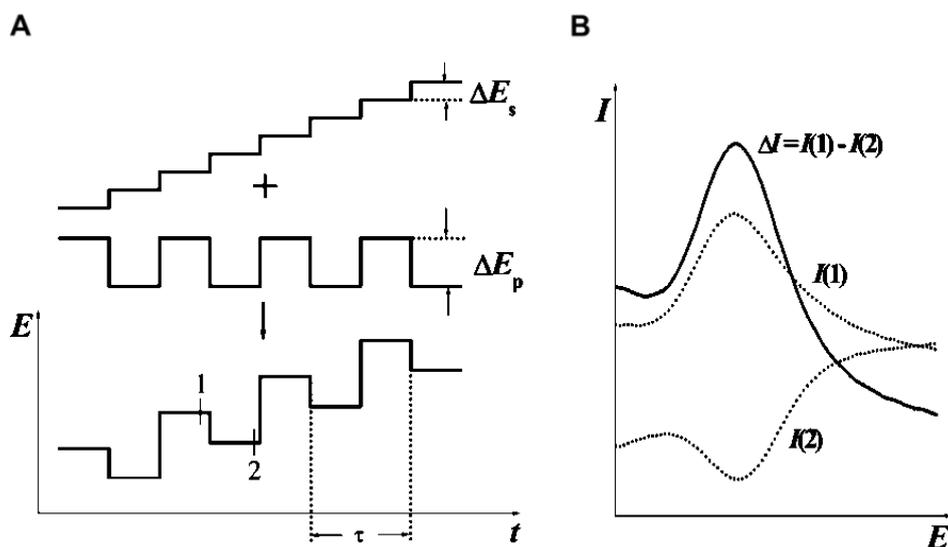
As leituras de corrente são realizadas em um instante vizinho à aplicação do pulso (t_1) e em outro próximo ao seu término (t_2) onde a corrente capacitiva é mínima. O valor final da corrente (I_f) é dado pela diferença entre as correntes medidas $I_f = I_2 - I_1$, nesta subtração se eliminam resíduos da corrente capacitiva. (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; SOUZA et al., 2003; WANG, 2006). A partir disso, o sinal resposta é apresentado como na **Figura 10B** é oriundo das reações faradaicas que por sua vez despolarizam os eletrodos.

O tempo t define a largura do pulso. Já o tempo t multiplicado ao ΔE_s define a velocidade de varredura (v). Através da largura à meia altura $W_{1/2}$ é possível determinar o mecanismo da reação de transferência de carga, tendo em vista que, para pequenas amplitudes de pulso, $W_{1/2}$ é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ($W_{1/2} = 90/n$). I_p é proporcional à concentração do analito e depende da velocidade da reação eletroquímica (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

1.3.3 Voltametria de onda quadrada

A técnica da voltametria de excitação por onda quadrada (SWV) é uma ferramenta versátil que pode ser utilizada para realizar experimentos com elevada rapidez e com maior sensibilidade em relação às outras técnicas pulsadas (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993). O seu resultado se origina da combinação entre uma variação de pulsos de potenciais na forma de uma onda quadrada (ΔE_p) adjunto a uma variação de potencial em escadas ΔE_s , com período t , **Figura 11A**. Cada ciclo de frequência da onda é função do período $f = t - 1$, dessa forma podem ser evidenciados dois pulsos, um no sentido anódico e outro no sentido catódico. (**Figura 11A**). A medição da corrente é realizada antes do final de ambos os pulsos, o que diminui o efeito da corrente capacitiva sobre a medida total. O sinal resposta é observado a partir da subtração das correntes no sentido direto (I_f – *forward current*) e reverso (I_b – *backward current*). Portanto $\Delta I_t = I(1) - I(2)$. O sinal resposta das correntes total, direta e reversa é apresentado na **Figura 11B** (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

Figura 11. Esquema de aplicação de potenciais (A) e resposta típica da SWV (B).



Fonte: (BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993)

As técnicas de pulso voltamétricas, geralmente são de grande relevância experimental, considerando suas altas resoluções e sensibilidades, que permitem uma boa separação dos picos, para melhor caracterizar as etapas subsequentes.

1.3.4. Estudos voltamétricos de moléculas biológicas: ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas

Devido às propriedades redox de inúmeras moléculas biológicas, tais como ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas, o comportamento eletroquímico dessas espécies tem sido exaustivamente investigado nos últimos anos em diferentes substratos eletroquímicos, como eletrodos de ouro, platina e carbono, utilizando técnicas voltamétricas como CV, DPV e SWV (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013; OSTATNÁ; ČERNOCKÁ; PALEČEK, 2012). Esses estudos são importantes uma vez que: esclarecem os mecanismos redox dessas moléculas e conseqüentemente suas possibilidades reacionais *in-vivo* como possíveis agentes oxidantes ou redutores, possíveis interações dessas espécies com fármacos e no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para uma série de aplicações biomédicas (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017)

1.3.5. Estudos voltamétricos de ácidos nucleicos e seus componentes

A oxidação das quatro bases do DNA livres, guanina, adenina, citosina e timina, em meio aquoso, foi investigada em eletrodos de carbono (BROTONS et al., 2015b; C. LOPES; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2013; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; DO NASCIMENTO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; SANJUÁN et al., 2016a). Todas as bases são eletroativas, **Quadro 5**, e apresentam um mecanismo de transferência de elétron com participação de prótons, conseqüentemente com um equilíbrio ácido base associado. As purinas (guanina e adenina) são eletrooxidadas mais facilmente em valores de potenciais mais negativos quando comparadas as bases pirimidinas, citosina e timina.

O mecanismo de oxidação da guanina foi proposto baseado nos dados voltamétricos e ocorre em duas etapas sucessivas irreversíveis dependentes do pH. A primeira etapa foi associada à oxidação da Gua para 8-oxo-guanina (8-oxoGua) e/ou Gua dímero, que sofre eletro-oxidação, segunda etapa (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; DO NASCIMENTO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018)

As bases dos nucleosídeos e nucleotídeos são também oxidadas em superfícies de carbono, entretanto quando essas são comparadas com suas

respectivas bases livres, são eletrooxidados em potenciais ~ 200 mV mais positivos. Isto significa que, mesmo não eletroativo o grupo açúcar dificulta significativamente a retirada dos elétrons dessas espécies. (OLIVEIRA et al., 2018).

A oxidação do DNA no eletrodo de carbono vítreo em meio fisiológico, pH ~ 7,0, dá origem a dois picos anódicos, facilmente detectáveis por (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). Um primeiro pico, de menor potencial, está associado à oxidação de resíduos da desoxiguanosina, enquanto um segundo pico anódico ocorre devido à eletro-oxidação dos resíduos da desoxiadenosina, **Quadro 5**. Contudo, os potenciais de oxidação são deslocados linearmente no sentido positivo de potencial com a diminuição do pH do meio. Além disso, as correntes de pico registradas para o dsDNA são muito inferiores quando comparadas com as correntes obtidas para o caso de DNA de fita simples (ssDNA), nas mesmas condições experimentais. Assim, por DPV pode-se também facilmente detectar se o DNA presente numa dada amostra se encontra em fita simples ou dupla. Na estrutura de dupla fita as bases eletroativas que sofrem eletro-oxidações, guanina e adenina, estão no interior da hélice dificultando deste modo a transferência de carga (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

Quadro 5. Potenciais de oxidação do dsDNA, bases livres e da 8-oxoguanine (8-oxoGua), em DPV, sob eletrodo de carbono vítreo

| Substância | Voltametria de Pulso Diferencial Potenciais de oxidação (V vs. Ag/AgCl) | |
|--------------|---|--|
| | pH = 4.5 | pH = 7.0 |
| dsDNA | $E_{p1a} = + 1,04 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,28 \text{ V}$ | $E_{p1a} = + 0,92 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,19 \text{ V}$ |
| Guanina | $E_{p1a} = + 0,85 \text{ V}$ | $E_{p1a} = + 0,67 \text{ V}$ |
| Adenina | $E_{p1a} = + 1,16 \text{ V}$ | $E_{p1a} = + 0,96 \text{ V}$ |
| Timina | $E_{p1a} = + 1,32 \text{ V}$ | $E_{p1a} = + 1,17 \text{ V}$ |
| Citosina | $E_{p1a} = \text{-----}$ | $E_{p1a} = + 1,31 \text{ V}$ |
| 8-oxoguanina | $E_{p1a} = + 0,45 \text{ V}$ | $E_{p1a} = \text{-----}$ |

Fonte: (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

A eletro-oxidação da 8-oxoGua, produto de oxidação da guanina, também ocorre em superfícies de carbono em valores de potenciais bem mais negativos quando comparado à guanina livre, **Quadro 5**, demonstrando assim a possibilidade de sua detecção com elevada sensibilidade mesmo na presença das outras bases e do próprio DNA, bem como da possibilidade de detectar eletroquimicamente se o DNA investigado sofreu possíveis danos oxidativos a partir de um contato anterior com um agente oxidante (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

Recentemente diferentes estudos voltamétricos vêm sendo realizados para investigar as propriedades redox de vários derivados metilados do DNA, tais como 5-metilcitosina e 7-mGua (DO NASCIMENTO et al., 2018; SANJUÁN et al., 2016b; WANG et al., 2011). A oxidação da 5-metilcitosina foi investigada por diferentes técnicas voltamétricas, em diferentes substratos eletroquímicos, como ouro e superfícies de carbono, e ocorre em valores de potenciais mais negativos quando comparada com a eletro-oxidação da base não metilada, citosina, nas mesmas condições experimentais (BROTONS et al., 2016a, 2016b).

A literatura também já contempla um vasto número de trabalhos sobre o comportamento eletroquímico da 7-mGua (BROTONS et al., 2015b, 2015a; BROTONS; M FELIU, 2015; DO NASCIMENTO et al., 2018; SANJUÁN et al., 2016b; STILLWELL et al., 1991). Essas investigações demonstram o comportamento redox da 7-mGua em diferentes substratos eletroquímicos, incluindo mercúrio (SEQUARIS et al., 1977; SEQUARIS; REYNAUD, 1975), ouro (BROTONS; M FELIU, 2015), carbono (BROTONS et al., 2015a; SANJUÁN et al., 2016b), eletrodos impressos de grafite (BROTONS et al., 2015a) e diamante dopado com boro (SANJUÁN et al., 2016b).

1.3.6. Estudos voltamétricos de aminoácidos e proteínas

Em 1980, foi demonstrada pela primeira vez a oxidação direta de proteínas, gerada pelos resíduos de aminoácidos, em eletrodos sólidos (BRABEC; MORNSTEIN, 1980a, 1980b; BRABEC; SCHINDLEROVA, 1981; REYNAUD; MALFOY, 1980).

A eletroquímica das proteínas baseada em resíduos de aminoácidos é fortemente depende da interação da proteína com a superfície do substrato

eletroquímico, geralmente de fraca adsorção (BRABEC; MORNSTEIN, 1980a; REYNAUD; MALFOY, 1980). Além disso, a orientação desfavorável da proteína na superfície do eletrodo reduz a acessibilidade dos seus centros eletroativos protegidos no interior das cadeias polipeptídicas, o que dificulta a oxidação (SHEN; HUANG; HU, 2002; ZHANG, H. et al., 2007). Considerando essas dificuldades, foi recentemente sugerida uma nova metodologia analítica em que a proteína é previamente desnaturada, utilizando agentes desnaturantes como ditioneitol e dodecil sulfato de sódio, facilitando assim o contato dos resíduos dos aminoácidos eletroativos com a superfície do substrato eletroquímico utilizado (OLIVEIRA; SANTARINO; OLIVEIRA-BRETT, 2013; SANTARINO; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2014).

Dos 20 aminoácidos principais constituintes das proteínas apenas 5 são eletro-oxidados em superfícies de carbono, o quais são, a tirosina (OLIVEIRA; SANTARINO; OLIVEIRA-BRETT, 2013; REYNAUD; MALFOY, 1980; SANTARINO; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2014), o triptofano (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA; SANTARINO; OLIVEIRA-BRETT, 2013), a histidina (ZHOU et al., 2017), a cisteína (CAO et al., 2018) e a metionina (HOOSHMAND; ES'HAGHI, 2017), **Quadro 6**.

Quadro 6. Potenciais de oxidação dos aminoácidos eletroativos em GCE, pH = 7,0.

| Aminoácido | Voltametria de Pulso Diferencial Potenciais de oxidação (V vs. Ag/AgCl) |
|------------------|--|
| Tirosina (Tyr) | $E_{p1a} = + 0,65 \text{ V}$ |
| Triptofano (Trp) | $E_{p1a} = + 0,65 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,05 \text{ V}$ |
| Histidina (His) | $E_{p1a} = + 1,25 \text{ V}$ |
| Cisteína (Cys) | $E_{p1a} = + 0,69 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,92 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,33 \text{ V}$ |
| Metionina (Met) | $E_{p1a} = + 1,05 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,35 \text{ V}$ |

Fonte: (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA; SANTARINO; OLIVEIRA-BRETT, 2013).

A molécula da tirosina possui o grupo fenólico, enquanto o triptofano o grupo indol, grupos funcionais que são oxidados em superfícies de carbono. A oxidação da Tyr ocorre em única etapa anódico, e envolve a retirada de um elétron e um próton do grupo fenólico com a formação de um radical altamente reativo (fenóxi) o qual pode polimerizar e/ou reagir com a água formando uma quinona (OLIVEIRA; SANTARINO; OLIVEIRA-BRETT, 2013; REYNAUD; MALFOY, 1980; SANTARINO; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2014).

No caso do triptofano sua oxidação ocorre em dois processos anódicos e envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons, levando a formação de 2-oxindolalanine (OLIVEIRA; SANTARINO; OLIVEIRA-BRETT, 2013; REYNAUD; MALFOY, 1980; SANTARINO; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2014) Histidina, cisteína e metionina podem ser oxidadas eletroquimicamente devido suas cadeias laterais (ARDAKANI et al., 2007; REYNAUD; MALFOY, 1980; ZHOU et al., 2007, 2017). Os centros eletroativos são o grupo imidazol, no caso da histidina, o grupo tiol, na cisteína e a metionina apresenta um átomo de enxofre que pode ser oxidado (ARDAKANI et al., 2007; REYNAUD; MALFOY, 1980).

1.3.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica que auxilia a caracterização eletroquímica de diferentes maneiras, tais como, investigar mecanismos redox, análise de corrosão, propriedades de adsorção de moléculas em interfaces e funcionamento de baterias (BARD; FAULKNER, 2001). Além disso, pode ser utilizada em diferentes estudos bioeletroquímicos (DO NASCIMENTO et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2019). A técnica de EIS envolve a aplicação de pequenas perturbações quando comparados com outros métodos de varredura linear ou de pulso. Essas perturbações impostas podem ser relacionadas com a razão da tensão (V) e a corrente (i) (BARD; FAULKNER, 2001)

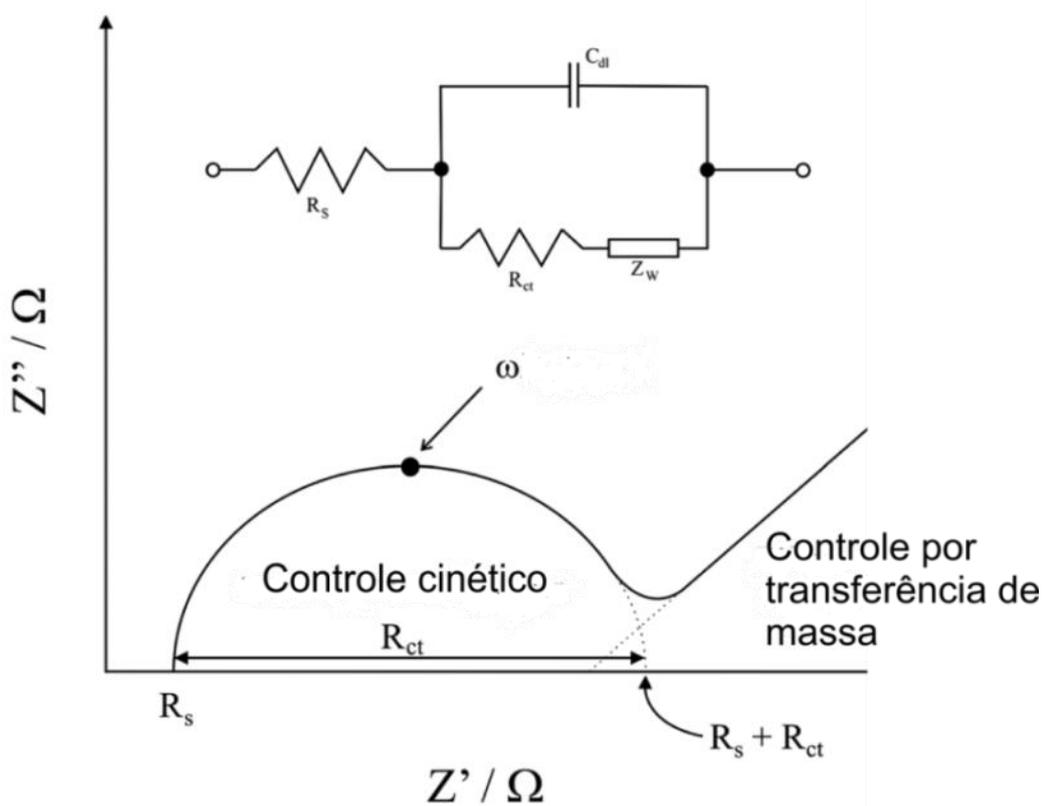
$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{i(j\omega)} \quad \text{Equação 2}$$

A impedância experimental é sempre obtida com um resultado de uma resistência e uma capacitância em série, que por sua vez é uma combinação entre a

resistência de transferência de carga (R_{ct}) e da impedância que mede a dificuldade da transferência de massa das espécies eletroativas, chamada de impedância de Warburg (Z_w). A **Figura 12** mostra o semicírculo, a linha reta e uma zona de transição entre as duas. Para sistemas diferentes os valores de R_{ct} e Z_w podem gerar variações na componente cinética e de transferência de massa (BARD; FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

O modelo de circuito equivalente de Randles e Ershler é essencialmente útil na modelagem dos fenômenos interfaciais, **Figura 12**, e inclui a capacitância da dupla camada C_{dl} , a resistência ôhmica da solução eletrolítica R_s , a resistência da transferência de elétrons R_{ct} e a impedância de Warburg Z_w , resultante da difusão de íons da solução para a superfície do eletrodo (BARD; FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

Figura 12. Gráfico de impedância no plano complexo de um sistema eletroquímico.



Os resultados de impedância, na maioria dos casos, podem ser coletados como o gráfico de Nyquist, como exemplo, **Figura 12**. Nesses espectros de impedância as componentes da impedância real (Z') e imaginária (Z'') são

registrados um contra o outro e contém informações geralmente abrangentes sobre a interface do eletrodo e a reação de transferência de carga (BARD; FAULKNER, 2001).

A interpretação do gráfico de Nyquist, para processos redox controlados predominantemente pela difusão, tem como característica uma região de semicírculo no eixo, seguida por uma linha reta. A região do semicírculo corresponde ao processo limitado pela transferência de elétrons observado em frequências mais altas enquanto a linha reta, em uma faixa de baixa frequência, representa o transporte de massa difusional, do seio da solução até a superfície do eletrodo da espécie química investigada. Os processos de transferência de elétrons muito lentos são caracterizados por uma grande região semicircular (BARD; FAULKNER, 2001; BERNALTE; CARROLL; BANKS, 2017; WANG, 2006).



CAPÍTULO 2. Objetivos



2.1. Objetivo geral

- Investigar as propriedades redox dos biomarcadores de doenças humanas 7-metil-guanosina, *orto*-tirosina e 3-nitro-tirosina, bem como desenvolver métodos eletroanalíticos para suas quantificações em GCE.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o comportamento anódico da 7-metil-guanosina, em meio aquoso, no eletrodo de carbono vítreo, utilizando técnicas voltamétricas e espectroscopia de impedância eletroquímica.
- Comparar a eletro-oxidação da 7-metil-guanosina no eletrodo de carbono vítreo, em meio aquoso, com a eletro-oxidação da 7-metil-guanina e da guanina.
- Estabelecer, com base nos dados eletroquímicos uma proposta de mecanismo de oxidação da 7-metil-guanosina.
- Investigar potencialidades das propriedades redox da 7-metil-guanosina para aplicações eletroanalíticas.
- Investigar o comportamento eletroquímico dos biomarcadores de estresse oxidativo *orto*-tirosina e 3-nitro-tirosina, em meio aquoso, no eletrodo de carbono vítreo utilizando técnicas voltamétricas e espectroscopia de impedância eletroquímica e compará-los com a *para*-tirosina.
- Estabelecer, com base nos dados eletroquímicos uma proposta de mecanismo de oxidação da *orto*-tirosina.
- Estabelecer, com base nos dados eletroquímicos uma proposta de mecanismo redox da 3-nitro-tirosina.
- Estabelecer com base nos dados eletroquímicos as diferenças reacionais da *orto*- e da 3-nitro-tirosina em relação a *para*-tirosina.
- Investigar potencialidades das propriedades redox da *orto*-tirosina e 3-nitro-tirosina para aplicações eletroanalíticas.



CAPÍTULO 3. Parte Experimental



3.1. Reagentes, materiais e metodologia

Todos os reagentes químicos foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados diretamente sem qualquer purificação adicional. Os reagentes foram 7-metil-guanosina (7-mGuo), 7-metil-guanina (7-mGua), guanina (Gua), guanosina (Guo), dsDNA, proveniente do timo de vitela (calf thymus) tipo II (“altamente polimerizado” 62% de Na/13% de água e comprimento de 10,000 – 15,000 bases de pares nitrogenadas), *para*-L-tirosina (p-Tyr), *orto*-DL-tirosina (o-Tyr) e 3-nitro-L-tirosina (3-NO₂-Tyr). Todas as soluções foram preparadas com água desionizada, condutividade < 0,1 μS cm⁻¹ (água ultrapura Millipore Milli-Q®).

A solução estoque de guanosina (1,0 × 10⁻² mol L⁻¹) foi preparada em solução tampão (pH = 4,4 e 7,2), **Tabela 1**, por aquecimento lento até próximo a 100 °C (OLIVEIRA-BRETT; ANTÔNIO DA SILVA; BRETT, 2002).

A solução estoque de Gua foi preparada em solução etanólica 20% até condições saturadas, e depois foi filtrada através de um filtro com diâmetro de poro de 0,42 μm (Whatman®). Ao final da filtração a concentração de 150 μmol L⁻¹ foi estabelecida por espectrofotometria na região do UV utilizando os parâmetros 243 nm, coeficiente de atenuação molar 10.700 cm⁻¹ M⁻¹ e caminho óptico de 10 mm. Esse procedimento foi realizado em triplicata (BROTONS et al., 2015a; FASMAN; COMPANY, 1977).

A solução saturada de 7-mGua foi preparada em soluções tampão (pH = 4.4 e 7.2) aquosas e posteriormente filtradas através de um filtro com diâmetro de poro de 0,42 μm (Whatman®) e a concentração final de 300 μM (± 4.3 μM, desvio de três amostragens) para a 7-mGua que por sua vez foi determinada por espectrofotometria na região do UV utilizando os parâmetros 254 nm, coeficiente de atenuação molar 7300 cm⁻¹ M⁻¹. Esse procedimento foi realizado em triplicata (BROTONS et al., 2015a; SVOBODA; KASAI, 2004).

As soluções estoque de 7-mGuo 500 μmol L⁻¹ e dsDNA 242.12 mg mL⁻¹ foram preparadas em água desionizada e armazenadas a 4 °C. A concentração da solução de dsDNA foi determinada pelo valor de absorbância a 260 nm (1 unidade A = 50 μg / mL de dsDNA).

As soluções estoque de 250 μmol L⁻¹ de p-Tyr, o-Tyr e 3-NO₂-Tyr foram preparadas diretamente em tampão acetato pH 4,5 ou fosfato pH = 7,0, **Tabela 1**.

As soluções eletrolíticas com diferentes valores de pH foram preparadas conforme a **Tabela 1**, o qual foram utilizados reagentes de grau analítico (BEYNON; EASTERBY, 1996). Para a aferição do pH foi utilizado um medidor de pH Metrohm Herisau (Suíça).

Tabela 1. Composição das soluções de eletrólito suporte.

| Eletrólitos suporte (diluições para 100 mL) | pH |
|--|-----|
| 0,2 mol L ⁻¹ NaOAc (3,7 mL) + 0,2 mol L ⁻¹ HAcO (46,3 mL) | 3,4 |
| 1 mol L ⁻¹ NaOAc (7,2 mL) + 1 mol L ⁻¹ HAcO (12,5 mL) | 4,4 |
| 0,2 mol L ⁻¹ NaOAc (41,2 mL) + 0,2 mol L ⁻¹ HAcO (8,8 mL) | 5,4 |
| 0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (6,15 mL) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (43,85 mL) | 6,1 |
| 0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (30,5 mL) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (19,5 mL) | 7,2 |
| 0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (47,35 mL) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (2,65 mL) | 8,0 |

3.2. Parâmetros voltamétricos e célula eletroquímica

Todas as medidas voltamétricas foram registradas, à temperatura ambiente (T = 25 °C), utilizando um potenciostato da Metrohm Autolab modelo PGSTAT 302N, rodando com o software NOVA (versão 2.0) (EcoChemie, Utrecht, Holanda), **Figura 13**. Um padrão de três eletrodos foi utilizado com um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GCE) com 1,6/3,0 mm de diâmetro, um fio de Pt como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag / AgCl (3 mol L⁻¹ KCl) como eletrodo de referência numa célula eletroquímica convencional de compartimento único de volume de 5 mL, **Figura 14**.

Os parâmetros usados para a DPV são: amplitude de pulso $\Delta E = 50$ mV, largura de pulso $\Delta t = 70$ ms e a velocidade de varredura $v = 5$ mV s⁻¹. Para a SWV as condições experimentais foram: amplitude de pulso $\Delta E = 20$ mV, frequência de 10 Hz e incremento potencial de 5 mV, correspondendo a uma velocidade de varredura

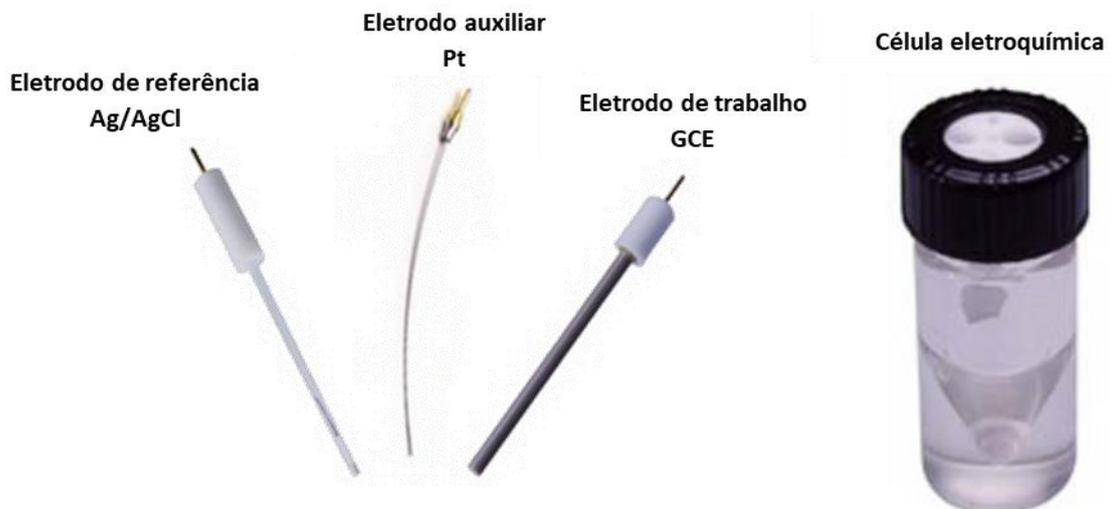
efetiva de 50 mV s^{-1} . Para a CV foram os seguintes parâmetros: degrau de potencial $\Delta E = 5 \text{ mV}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

As medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) foram realizadas usando um módulo FRA inserido no software NOVA (versão 2.0). Uma perturbação de raiz quadrática média (rms) de 5 mV foi aplicada na faixa de frequência de $65 \text{ kHz} - 0,01 \text{ Hz}$ com cinco valores de frequência por década em potenciais escolhidos na faixa $+ 0,2 - + 1,40 \text{ V}$.

Figura 13. Imagem do potenciostato.



Figura 14. Imagem da célula eletroquímica e dos eletrodos utilizados.



O GCE foi polido utilizando alumina (tamanho de partícula $1 \mu\text{m}$) antes de cada ensaio eletroquímico. Após polimento, o eletrodo foi cuidadosamente enxaguado com água deionizada. Após este tratamento mecânico, o GCE foi colocado no eletrólito suporte e vários varreduras foram registradas até que um

voltamograma de linha de base estável fosse obtido. Este procedimento assegurou resultados experimentais reprodutíveis.

3.3. Aquisição e apresentação de dados voltamétricos

Todos os voltamogramas de DP apresentados neste trabalho foram submetidos ao método matemático de média móvel para aplicação de correção de linha de base, com uma janela de passos de 2 mV incluída no software NOVA versão 2.0. Este tratamento matemático melhora a visualização e identificação de picos sobre a linha de base, embora a corrente de pico seja em alguns casos reduzida (<10%) em relação à curva não tratada. No entanto, o tratamento matemático dos voltamogramas originais de pulso diferencial foi utilizado na apresentação de todos os dados de DPV para uma melhor e mais clara identificação dos picos. Os valores de corrente de pico apresentados em todos os gráficos foram determinados a partir dos voltamogramas originais não tratados após subtração da linha de base.



***CAPÍTULO 4. 7-metilguanossina:
mecanismo de oxidação e
quantificação eletroanalítica***



4.1. Estudo eletroquímico e eletroanalítico do biomarcador 7-metil-guanosina

Neste capítulo será apresentado o estudo do comportamento anódico da 7-mGuo e da sua potencialidade para futuras aplicações analíticas, o qual foi dividido em três etapas, como seguem. Na primeira foi investigado a eletro-oxidação da 7-mGuo no GCE em diferentes condições experimentais, concentração, ampla faixa de pH e a partir de diferentes técnicas eletroquímicas CV, DPV e EIS. Baseado nos dados eletroquímicos o mecanismo de oxidação da 7-mGuo foi então proposto. Na segunda etapa um método eletroanalítico utilizando DPV para detecção e quantificação da 7-mGuo em tampão fosfato (pH = 7,2) foi desenvolvido. Na última parte foi realizado um estudo de possíveis interferentes na detecção e quantificação da 7-mGuo, como a 7-mGua e componentes de ácidos nucleicos (bases livres, nucleosídeos e nucleotídeos), visando a possível aplicação do método eletroanalítico proposto em amostras reais.

4.2 Resultados e discussão

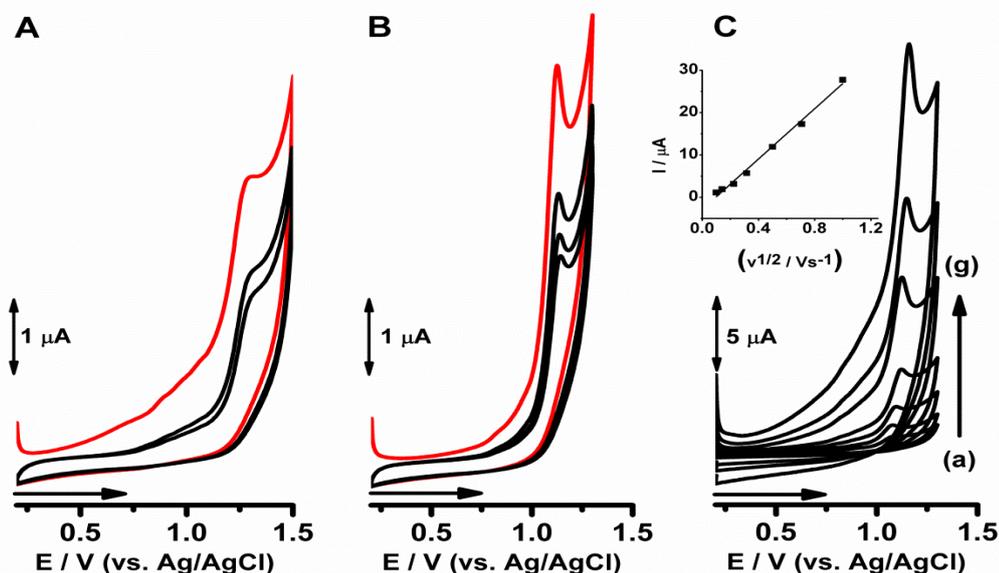
4.2.1 Mecanismo de oxidação da 7-metil-guanosina

4.2.1.1 Voltametria Cíclica

A oxidação da 7-mGuo em GCE foi investigada primeiramente por CV, a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , em tampão acetato (pH = 4,4) e tampão fosfato (pH = 7,2), **Figura 15A e 15B**. Os CVs sucessivos foram todos registrados em uma solução de 7-mGuo de concentração $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, em uma faixa de potencial de + 0,2 V a + 1,3 V e todos detectaram apenas um único pico de oxidação bem definido e irreversível, em $E_{\text{pa}} = + 1,23 \text{ V}$ (pH = 4,4) e $E_{\text{pa}} = + 1,08 \text{ V}$ (pH = 7,2). Ao mesmo tempo, em ambos os pHs investigados, se verifica uma diminuição na corrente de pico a partir da segunda varredura de potencial, **Figura 15A e 15B**, essa diminuição pode ser atribuída a possíveis produtos da oxidação de 7-mGuo, que são adsorvidos na superfície do eletrodo de trabalho. Do mesmo modo, pode-se constatar que existe um equilíbrio ácido-base, uma vez que o processo é dependente do pH do meio (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

Os resultados voltamétricos da 7-mGuo, **Figura 15A e 15B**, são semelhantes quando comparados com a oxidação da 7-mGua no SPGE (BROTONS et al., 2015a), apresentando apenas um processo anódico irreversível, dependente do pH e com produtos de oxidação que são adsorvidos na superfície do eletrodo. No entanto, em meio ácido (pH = 4,0) o pico anódico da 7-mGua é detectado no SPGE em $E_{pa} = 0,81$ V, enquanto a oxidação da 7-mGuo no GCE em pH = 4,4 ocorre em $E_{pa} = + 1,23$ V, uma diferença de ~ 400 mV entre seus potenciais de pico.

Figura 15. CVs sucessivos da 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato, pH = 4,4 e (B) tampão fosfato, pH = 7,2. (—) Primeira varredura, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (C) CVs da 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7,2, sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 50, 100, 250, 500 e 1000 mV s^{-1}).



Este resultado é previsível considerando os efeitos estéricos na molécula da 7-mGuo, causados pela ligação glicosídica no sistema π do anel da guanina, dificultando sua oxidação (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017). Por outro lado, quando a oxidação da 7-mGuo é comparada com a oxidação da Guo em GCE (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017), seu potencial é deslocado para valores mais positivos (~ 200 mV) em pH fisiológico, $E_{pa} = + 1,08$ V, podendo ser atribuído aos impedimentos estéricos causados apenas pelo grupo metila. Portanto, essas informações corroboram com a possibilidade da detecção eletroquímica dessas espécies com elevada seletividade usando técnicas voltamétricas.

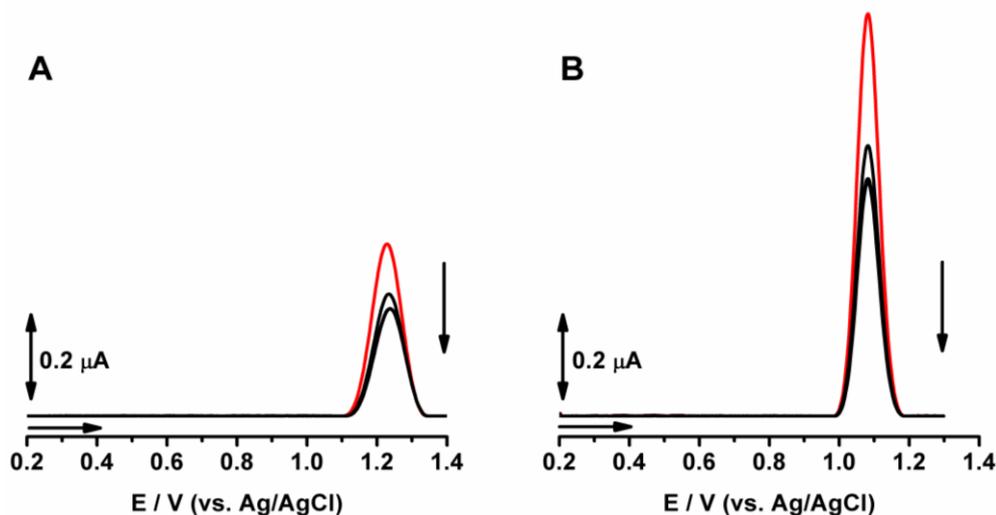
O efeito da velocidade de varredura em função da corrente de pico anódico da resposta eletroquímica da 7-mGuo foi investigada utilizando a técnica CV em uma solução de 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7,2. Os

voltamogramas foram registrados em uma faixa de potencial de + 0,4 a + 1,3 V e com diferentes velocidades de varredura ($10 - 100 \text{ mV s}^{-1}$), **Figura 15C**. Entre os voltamogramas registrados, a superfície do eletrodo foi sempre polida e lavada com água deionizada e posteriormente tratada também eletroquimicamente, evitando possíveis adversidades, como exemplo, a adsorção de produtos de oxidação da 7-mGuo. Pode-se evidenciar que o sistema caracteriza-se como irreversível, com um pequeno desvio positivo no potencial de pico da 7-mGuo nas velocidades mais elevadas e controlado por difusão, **Figura 15C**. Considerando que, o gráfico da corrente de pico versus a raiz quadrada da velocidade de varredura exibiu uma relação linear, $r = 0,995$ (**Figura 15C, inserção**), que é consistente com a equação de Randles-Sevcik para sistemas irreversíveis controlados por difusão, *Seção 1.3.1* (GUIDELLI et al., 2014b, 2014a; QUEIROZ et al., 2018; SHIMIZU; SEPUNARU; COMPTON, 2016).

4.2.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Voltamogramas de DP sucessivos foram registrados para uma solução de 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão acetato (pH = 4,4) e em meio fisiológico (pH = 7,2), **Figura 16**.

Figura 16. DPV sucessivos (com correção da linha de base) da 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato, pH 4,4 e (B) tampão fosfato, pH = 7,2. (—) Primeira varredura, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



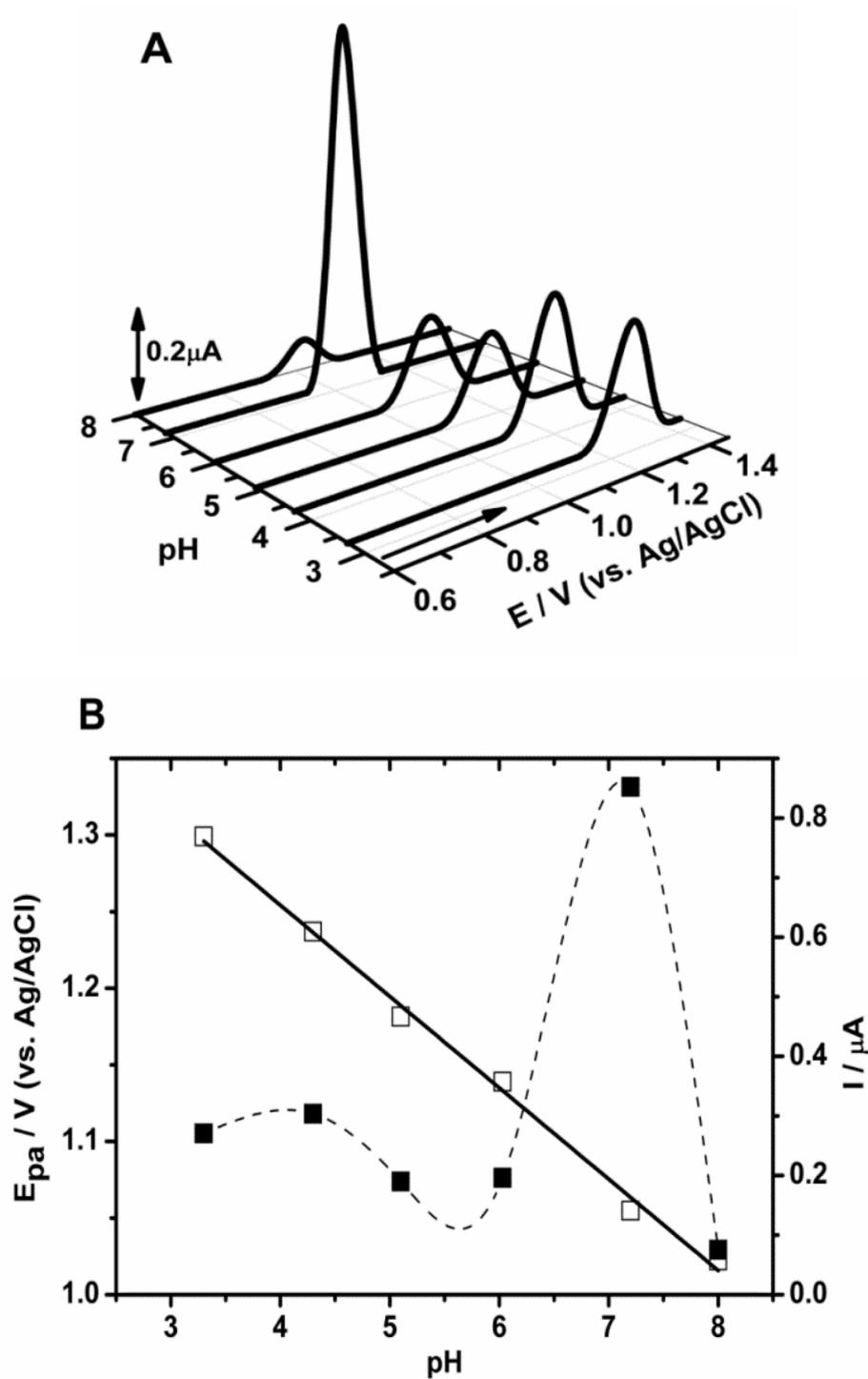
A oxidação da 7-mGuo em meio ácido e na janela de potencial de + 0,20 a +1,40 V, detectou apenas um pico de oxidação, em $E_{pa} = + 1,22$ V, **Figura 16A**. A oxidação de 7-mGuo em meio fisiológico na janela de potencial de + 0,20 a + 1,30 V, detectou um único processo anódico em todos os voltamogramas registrados com um valor de potencial de pico mais negativo, em $E_{pa} = + 1,08$ V, **Figura 16B**, quando comparado aos resultados do pH = 4.5, **Figura 16A**, no geral esses resultados de DPV são concordantes com aqueles obtidos por CV, *Seção 4.2.2.1*.

Assim, para estabelecer o número de elétrons e prótons que participam no processo de oxidação da 7-mGuo, bem como para estabelecer as melhores condições experimentais para o desenvolvimento de um método eletroanalítico para sua detecção e quantificação, a influência do pH na eletro-oxidação da 7-mGuo foi investigada em diferentes eletrólitos suporte, em uma faixa de pH entre 3,0 e 9,0, **Tabela 1** da parte experimental, utilizando voltametria de DP, **Figura 17A**. Observa-se claramente uma forte influência do pH do meio na resposta voltamétrica da 7-mGuo, revelando uma maior corrente de pico no meio fisiológico, pH = 7,2, **Figura 17A e 17B**. Assim, esta condição experimental foi selecionada como ideal em relação à sensibilidade e estabilidade da detecção eletroquímica da 7-mGuo. Por outro lado, nenhum pico foi detectado em pH maior que 8, demonstrando que em pH alcalino a 7-mGuo não é eletroativa, possivelmente devido a uma mudança estrutural bem significativa do nucleosídeo.

Uma dependência linear (~ 59 mV pH⁻¹) entre o potencial de pico da 7-mGuo e o pH da solução (pH = 3,5 - 8,0) foi observada, **Figura 17B**, demonstrando a existência de um equilíbrio ácido-base, onde são transferidos o mesmo número de elétrons-prótons (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993). Considerando que, para o pico anódico da 7-mGuo, $W_{1/2}$ é ~ 95 mV, pode ser determinado que a reação ocorre com a retirada de um elétron e um próton, *Seção 1.3.1* (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993). Em relação ao mecanismo de oxidação da 7-mGua, Brotons et al (BROTONS et al., 2015a). relataram no SPGE uma dependência do pH de 27 mV pH⁻¹ (pH = 3-9, soluções tampão fosfato), enquanto Sanjuán et al. (SANJUÁN et al., 2016b) mostraram no eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE) um valor de 59 mV pH⁻¹ (pH = 2,5-8,5, soluções tampão acetato). Do mesmo modo, na literatura é claramente relatado que a oxidação do Gua ocorre em substratos de carbono com

um valor próximo ao teórico de Nernstian de 59 mV pH^{-1} (BRETT; PIEDADE; SERRANO, 2000; DENG et al., 2012; SANJUÁN et al., 2016a; WANG et al., 2011).

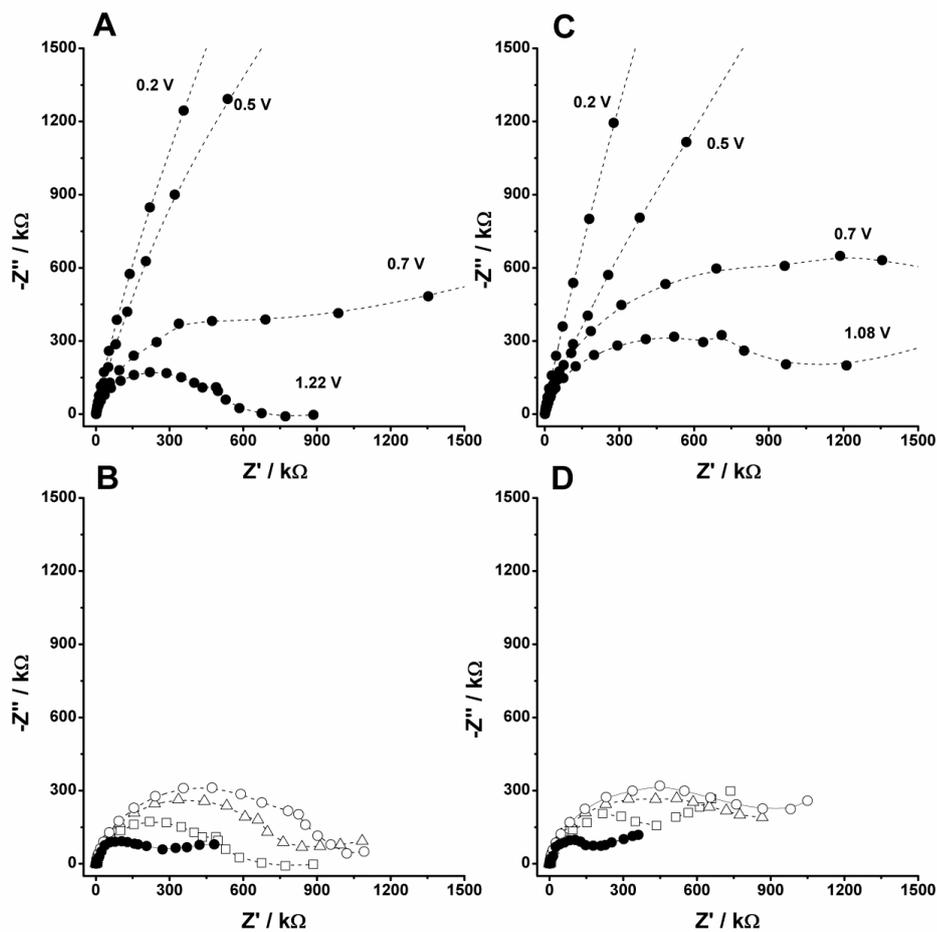
Figura 17. (A) gráfico 3D de DPV (com correção da linha de base) da 7-MeGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ vs. pH. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. **(B)** Gráficos de (■) I_{pa} e (□) E_{pa} vs. pH.



4.2.1.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) oferece inúmeras possibilidades para investigações de sistemas eletroquímicos, tais como processos de eletrodos em relação a contribuições de difusão, adsorção, cinética, dupla camada, reações homogêneas acopladas, etc. (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006). Assim, a oxidação da 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi investigada por EIS, em tampão acetato ($\text{pH} = 4,4$) e tampão fosfato ($\text{pH} = 7,2$), **Figura 18**.

Figura 18. EIS da 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ para diferentes potenciais **(A)** $\text{pH} = 4,4$ e **(C)** $\text{pH} = 7,2$. EIS sucessivos da 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, **(B)** aplicando o potencial fixo de $1,22 \text{ V}$ em $\text{pH} = 4,4$ e **(D)** aplicando um potencial de $1,08 \text{ V}$ em $\text{pH} = 7,2$.



Inicialmente os espectros EIS foram registrados em diferentes potenciais, evidencia-se claramente a influência do potencial aplicado sobre a forma do

espectro de impedância. Observa-se que a resposta de impedância é essencialmente capacitiva, uma linha reta a um ângulo menor que 90° para potenciais menores em relação a oxidação da 7-mGuo (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993). Contudo, à medida que os valores de potencial aproximam-se do potencial de oxidação da 7-mGuo, em tampão acetato a + 1,22 V, **Figura 18A**, um semicírculo em altas frequências passa a existir e pode ser atribuído à reação de transferência de carga, enquanto na faixa de baixa frequência, observa-se uma linha reta, que por sua vez, está associada a um processo de oxidação limitado por difusão (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006). Em pH = 7,2 o semicírculo foi detectado quando aplicado o potencial fixado em + 1,08 V, **Figura 18C e 18D**.

Espectros sucessivos de EIS foram registrados numa solução de 7-mGuo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, com um potencial aplicado de 1,22 V em tampão acetato (pH = 4,4) e 1,08 V em tampão fosfato (pH = 7,2), **Figura 18B e 18D**. Pode-se observar um aumento no semicírculo dos espectros de EIS com os registros sucessivos, esse evento ocorre devido à adsorção de produtos de oxidação da 7-mGuo na superfície do GCE, que de certa forma acarreta na elevação da resistência do processo de transferência de carga (OLIVEIRA-BRETT; BRETT, 2002). Todos os espectros de EIS apresentados na **Figura 18** foram modelados pelo circuito de Randles (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006), **Figura 12**, que inclui a resistência ôhmica do eletrólito suporte (R_Ω), o elemento de fase constante (CPE), a resistência de transferência de carga (R_{ct}) e a impedância de Warburg (Z_W), resultante da difusão da 7-mGuo do seio da solução para a superfície do GCE, *Seção 4.2.1.1* (WANG, 2006).

Os valores quantitativos, para R_{ct} e CPE, são mostrados na **Tabela 2**. O diâmetro do semicírculo é uma medida da R_{ct} e observa-se um aumento dos seus valores com o avanço nas varreduras sucessivas de EIS. Esses resultados confirmam a adsorção de produtos de oxidação da 7-mGuo na superfície do GCE, como já esperado considerando os resultados anteriores de CV, *Seção 4.2.1.1*.

A oxidação da 7-mGua $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ também foi investigada por EIS, em tampão acetato (pH = 4,4), tampão fosfato (pH 7,2) e apresentou espectros de oxidação + 0,94 V para o meio ácido e + 0,88 V para o fisiológico, **Figura 19A e 19C**. Os parâmetros experimentais foram conduzidos da mesma maneira dos ensaios de EIS para a 7-mGuo. Inicialmente os espectros EIS foram registrados em

diferentes potenciais, **Figura 19A e 19C**, e, como esperado, em valores de potencial abaixo do necessário para a oxidação da 7-mGua a resposta da impedância é essencialmente capacitiva. No entanto, quando aplicado o potencial + 0,94 V (**Figura 19A**), em tampão acetato, evidencia-se um semicírculo devido à transferência de carga, enquanto na faixa de baixa frequência uma linha reta, que por sua vez está associada a um processo de oxidação limitado por difusão, **Seção 4.2.1.1** (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

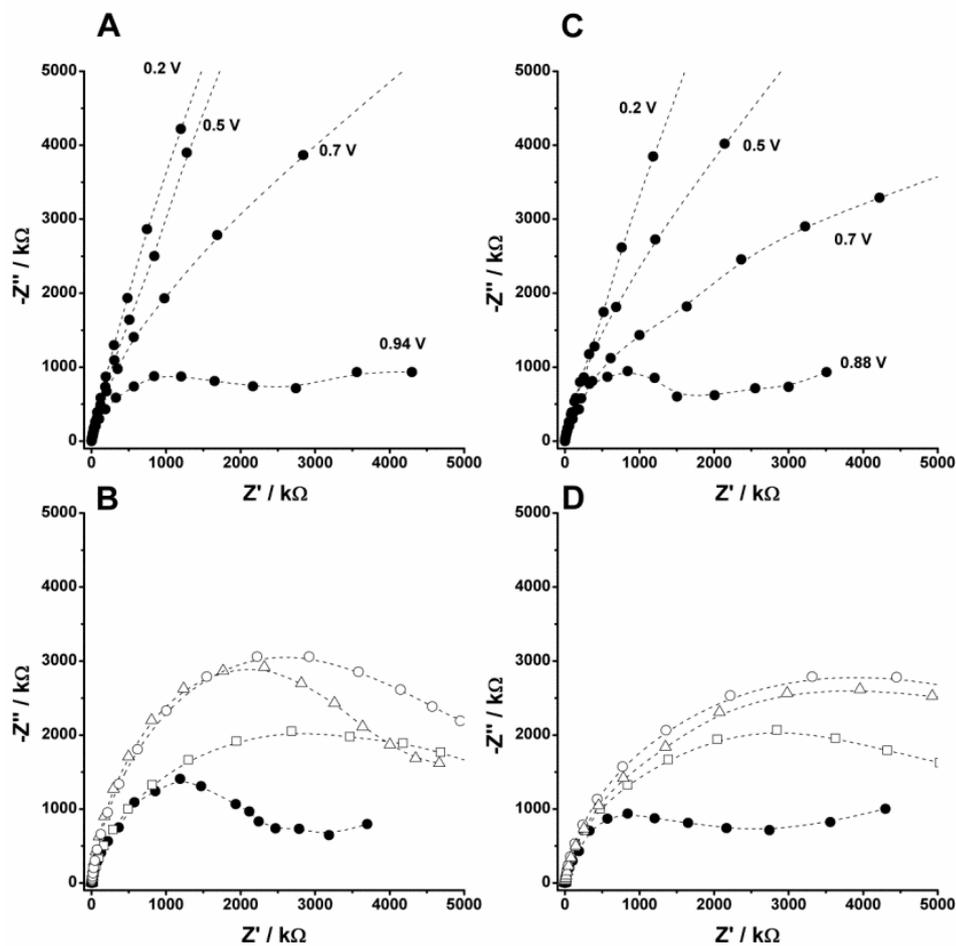
Tabela 2. Parâmetros de ajuste dos dados de impedância para 7-mGuo 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na superfície do GCE.

| Espectros de impedância consecutivos 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 7-mGuo | $R_{ct} / \text{k}\Omega \text{ cm}^2$ | CPE / $\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{n-1}$ |
|--|--|---|
| A 1.22 V em tampão acetato (pH = 4.4) | | |
| Varredura 1 | 445,30 | 1,068 |
| Varredura 2 | 736,35 | 9,457 |
| Varredura 3 | 885,80 | 9,163 |
| A 1.08 V em tampão fosfato (pH = 7.2) | | |
| Varredura 1 | 475,93 | 22,827 |
| Varredura 2 | 769,95 | 24,005 |
| Varredura 3 | 864,97 | 23,670 |

Nos espectros sucessivos, **Figura 19B e 19D** observa-se o aumento dos semicírculos com o número das varreduras, demonstrando à adsorção de produtos de oxidação da 7-mGua no GCE, formando um filme resistivo na superfície do eletrodo e conseqüentemente dificultando a transferência de carga do processo de novos processos de oxidação. Todos os espectros de EIS apresentados na **Figura 19** foram modelados pelo circuito de Randles, **Seção 1.3.4**. Os valores ajustados, para R_{ct} e CPE, são mostrados na **Tabela 3** e, como esperado, foi observado que os valores da R_{ct} aumentam com os espectros sucessivos de EI.

Os resultados de EIS são mais conclusivos quando comparados com os resultados de CV e DPV, uma vez que o potencial do pico anódico da espécie investigada (7-mGua e 7-mGuo) é aplicado por um longo período de tempo (duração do registro do espectro de impedância), gerando mais produtos da oxidação na superfície do substrato eletroquímico e conseqüentemente maior contaminação via adsorção.

Figura 19. EIS da 7-mGua $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ para diferentes potenciais **(A)** pH = 4,4 e **(C)** pH = 7,2. EIS sucessivos da 7-mGua $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, **(B)** aplicando o potencial fixo de 0,94 V em pH = 4,4 e **(D)** aplicando um potencial de 0,88 V em pH = 7,2.



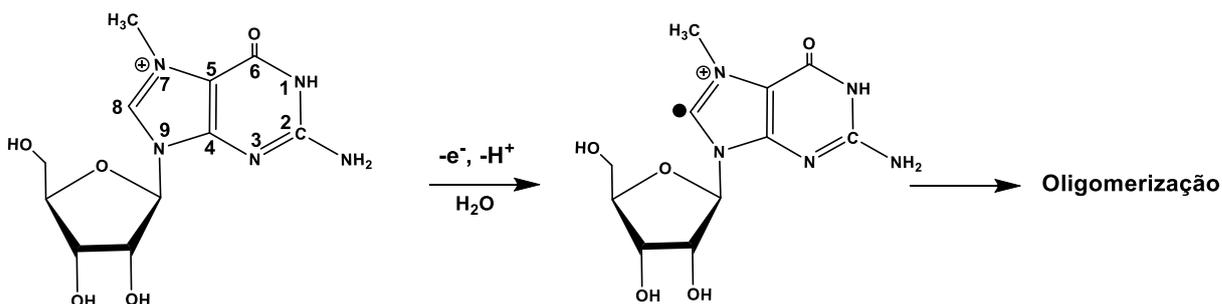
Esses resultados de EIS corroboram com os resultados de CV e DPV, e são de fundamental importância para a detecção da 7-mGua e da 7-mGuo na superfície do carbono, porque estabelecem de fato sua cinética e mecanismo de interação com o substrato.

Tabela 3. Parâmetros de ajuste dos dados de impedância para 7-mGua $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ na superfície do GCE.

| Espectros de impedância consecutivos $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ 7-mGua | $R_{ct} / \text{k}\Omega \text{ cm}^2$ | $\text{CPE} / \mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{n-1}$ |
|--|--|--|
| A 0.94 V em tampão acetato (pH = 4.4) | | |
| Varredura 1 | 475.30 | 1.068 |
| Varredura 2 | 736.35 | 9.457 |
| Varredura 3 | 885.80 | 9.163 |
| A 0.88 V em tampão fosfato (pH = 7.2) | | |
| Varredura 1 | 445.93 | 445.93 |
| Varredura 2 | 769.95 | 769.95 |
| Varredura 3 | 864.97 | 864.97 |

Considerando os resultados aqui apresentados de CV, DPV, EIS e a literatura consultada (BROTONS et al., 2015a; LI; BATCHELOR-MCAULEY; COMPTON, 2010; SANJUÁN et al., 2016a) o mecanismo de oxidação da 7-mGuo foi associado com a oxidação da Gua, com a transferência de $-1e$, $-1H^+$ produzindo um radical intermediário, **Esquema 1**. A reação de oligomerização possivelmente ocorre como a última etapa do mecanismo de reação proposto. Os resultados também demonstraram, como esperado, que o grupo metil e a desoxirribose não são eletroativos na superfície da GCE, mas influenciam fortemente a oxidação da 7-mGuo, pois seu potencial de pico anódico é deslocado para valores bem mais positivos quando comparados com a Gua livre, 7-mGua e com a Guo (BROTONS et al., 2015a; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; SANJUÁN et al., 2016b).

Esquema 1. Proposta de mecanismo de oxidação eletroquímica de 7-mGuo.

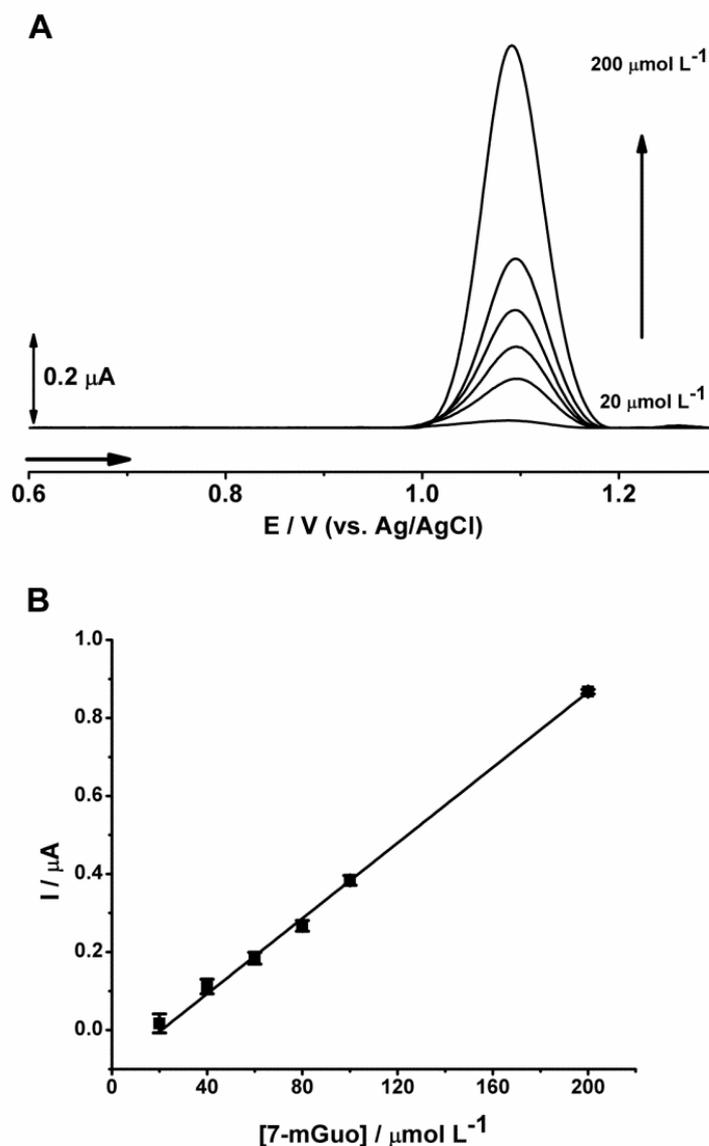


4.2.2 Detecção eletroquímica da 7-metil-guanosina

A oxidação da 7-mGuo em GCE foi investigada utilizando DPV para o desenvolvimento de um método eletroanalítico para sua detecção e quantificação. De tal modo, nas condições experimentais otimizadas, voltamogramas de DP foram registrados, numa janela de potencial de 0,6 V a 1,3 V, em tampão fosfato (pH = 7,2) numa faixa de concentração de 20 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, **Figura 20A**. Para cada concentração os voltamogramas de DP foram registrados em triplicata e antes de cada varredura foi realizada a limpeza física e eletroquímica da superfície do eletrodo. Foi observado um aumento da corrente do pico da 7-mGuo linearmente com sua concentração, **Figura 20A**.

A curva analítica, correspondente foi gerada por regressão linear através do método dos mínimos quadrados, **Figura 20B**, e demonstra uma excelente linearidade, com um coeficiente de correlação 0,998 e a equação da reta $I_{pa} = 0,0047 (\pm 0,0001) [7\text{-mGuo} / \mu\text{mol L}^{-1}] - 0,09 (\pm 0,01)$. O limite de detecção foi de 3,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($3 \sigma / S$, onde σ é o desvio padrão dos sinais de 10 varreuras em branco e S da sensibilidade) e o limite de quantificação foi de 10,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($10 \sigma / S$).

Figura 20. (A) DPVs (com correção da linha de base) de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 7-mGuo e (B) Curva analítica em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7,2, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



4.2.3 Estudo de possíveis interferentes na detecção eletroanalítica da 7-mGuo

Com o objetivo de detectar eletroquimicamente a 7-mGuo sua oxidação foi investigada no GCE, em meio ácido (pH = 4,2) e fisiológico (pH = 7,2), na presença de possíveis interferentes como Gua, 7-mGua e Guo, **Figuras 21A e 21C**. Como esperado, em meio ácido a oxidação da Gua ocorre em $E_{\text{pa}} = + 0,76 \text{ V}$ (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017) e é o composto mais facilmente oxidável. A oxidação da 7-mGua ocorreu em $E_{\text{pa}} = + 0,93 \text{ V}$, muito próximo ao pico de oxidação da Guo, em $E_{\text{pa}} = + 0,97 \text{ V}$. O pico anódico da 7-mGuo foi detectado em $E_{\text{pa}} = + 1,23 \text{ V}$, sendo o

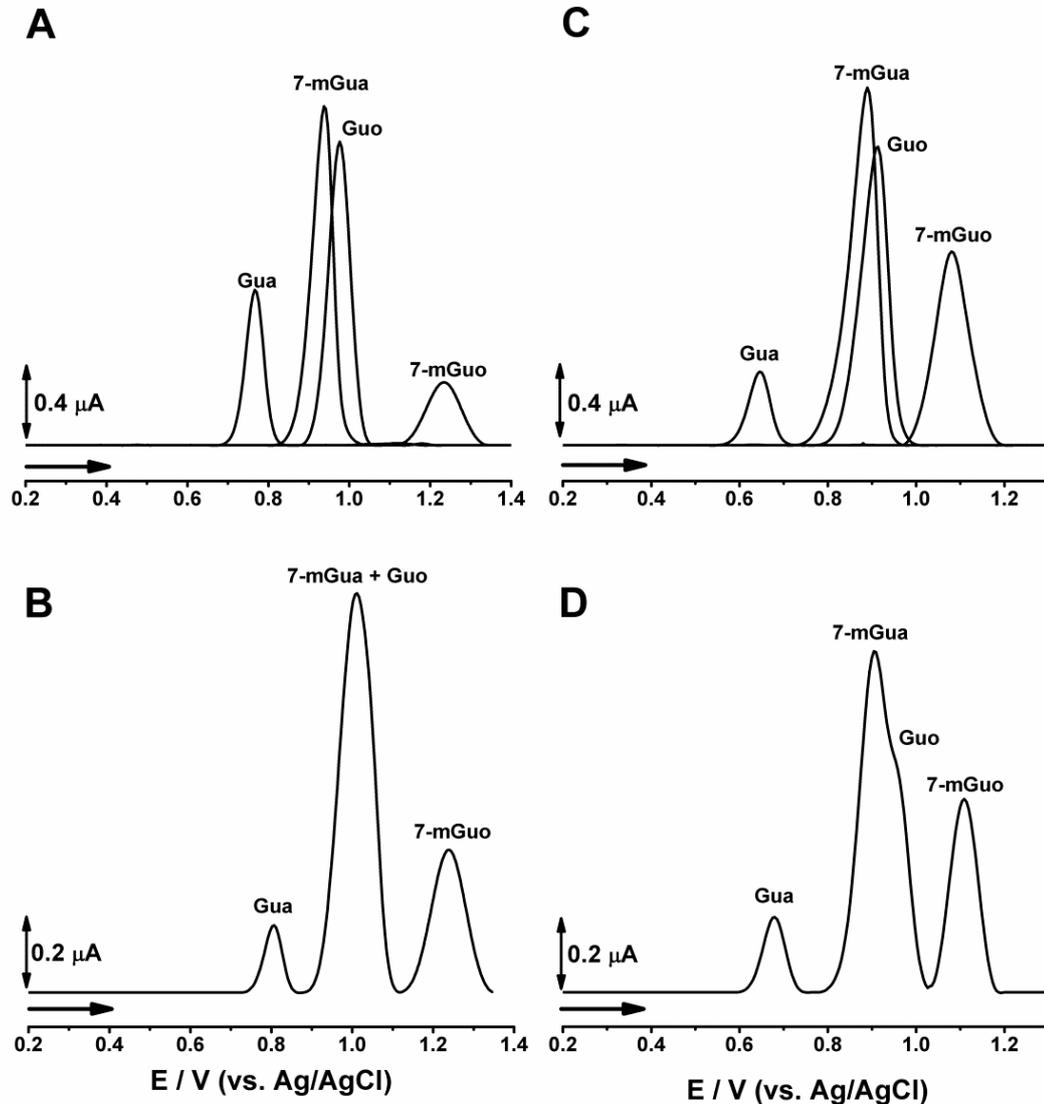
composto mais dificilmente oxidável, considerando os efeitos estéricos na sua estrutura causados devido a presença do grupo metila e da desoxirribose.

Os resultados de voltametria de pulso diferencial em GCE para Gua $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, 7-mGua $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, Guo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 7-mGuo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio neutro, $\text{pH} = 7,2$, **Figura 21C**, demonstraram que todos os picos anódicos foram deslocados para valores de potenciais mais negativos, quando comparados com os resultados em meio ácido, **Figura 21A**, onde o pico de oxidação da Gua foi detectado em $E_{\text{pa}} = + 0,64 \text{ V}$, da 7-mGua em $E_{\text{pa}} = + 0,88 \text{ V}$, da Guo em $E_{\text{pa}} = + 0,91 \text{ V}$ e da 7-mGuo em $E_{\text{pa}} = + 1,08 \text{ V}$.

Considerando os resultados anteriores, é importante também investigar a detecção eletroquímica dessas espécies numa mesma solução para verificação das possíveis interferências e da possibilidade da detecção simultânea, assim as seguintes misturas foram preparadas e analisadas por voltametria de pulso diferencial: Gua $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ + Guo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 7-mGua $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 7-mGuo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio ácido e fisiológico, **Figuras 21B e 21D**.

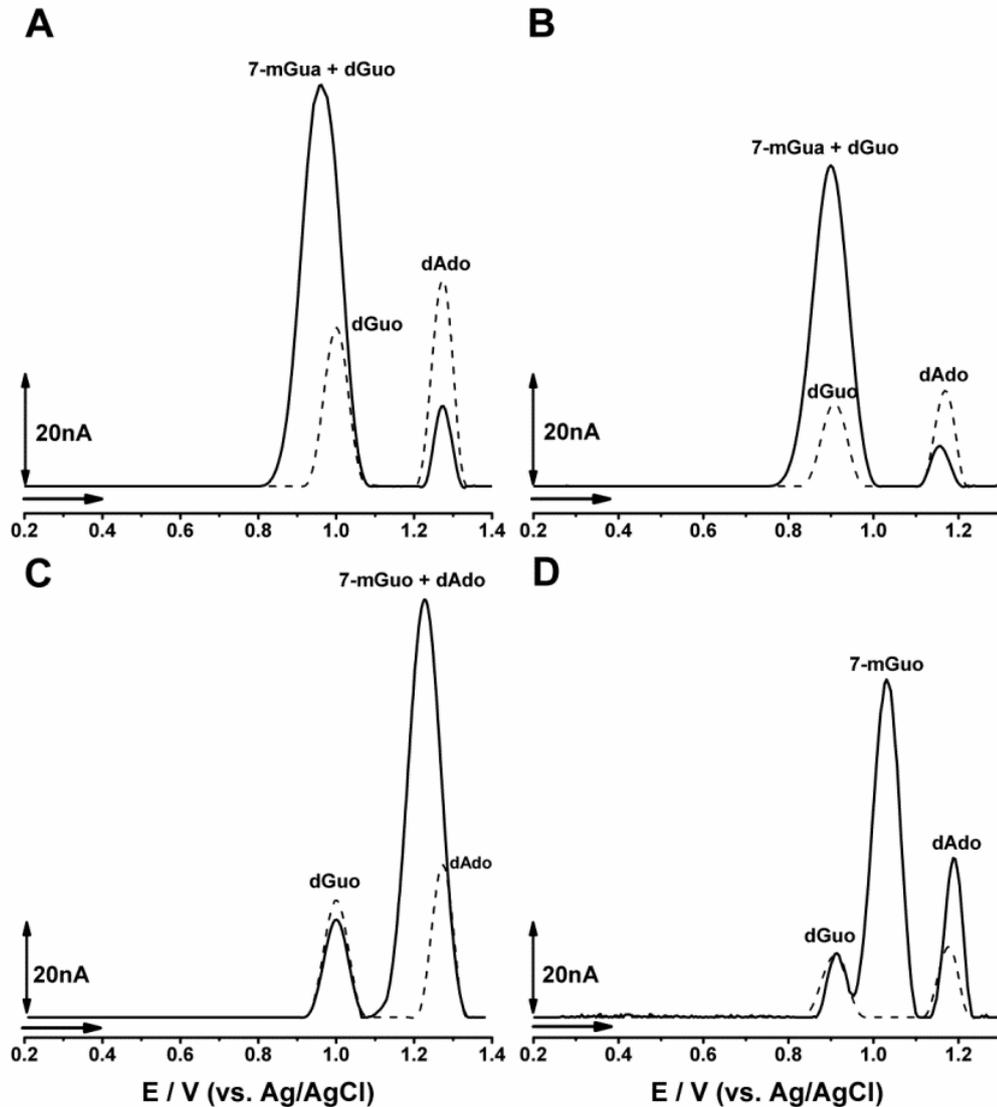
Em tampão acetato ($\text{pH} = 4,4$), a presença de todas essas espécies numa mesma solução deslocou o potencial do pico da Gua $\sim 40 \text{ mV}$ para um valor mais positivo, enquanto que a oxidação da 7-mGua sofreu total sobreposição com a Guo e apenas um único pico anódico foi detectado, **Figura 21B**. A oxidação da 7-mGuo ocorreu em $E_{\text{pa}} = 1,23 \text{ V}$ e não foi observada interferência significativa (potencial) quando comparado com os resultados da **Figura 21A**. Este experimento foi repetido em tampão fosfato ($\text{pH} = 7,2$), **Figura 21D**, e o mesmo comportamento, quando comparado com os resultados em $\text{pH} = 4,4$, **Figura 21B**, foi detectado. No entanto, a oxidação da 7-mGua sofreu sobreposição com a oxidação da Guo com $\sim 30 \text{ mV}$ de diferença e, diferentemente do meio ácido, dois picos anódicos sobrepostos foram detectados.

Figura 21. DPV sucessivos (com correção de linha de base) da Gua $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, 7-mGua $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, Guo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 7-mGuo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato pH = 4,4 e (C) em tampão fosfato pH = 7,2. DPVs da mistura Gua $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 7-mGua $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ + Guo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 7-mGuo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (B) tampão acetato pH = 4,4 e (D) em tampão fosfato pH = 7,2.



A eletro-oxidação da 7-mGuo e da 7-mGua foram investigadas na presença da molécula do dsDNA, a partir das seguintes misturas: 7-mGua $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ + dsDNA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 7-mGuo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ + dsDNA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, em tampão acetato, pH = 4,4 e em tampão fosfato, pH = 7,2, **Figura 22.**

Figura 22. DPV (com correção de linha de base) das misturas da 7-mGua $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ + dsDNA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em **(A)** tampão acetato pH = 4,4 e **(B)** em tampão fosfato pH = 7,2. DPVs (com correção de linha de base) das misturas da 7-mGuo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ + dsDNA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em **(C)** tampão acetato pH = 4,4 e **(D)** em tampão fosfato pH = 7,2. DPV da solução de dsDNA 50mg mL^{-1} controle (----).

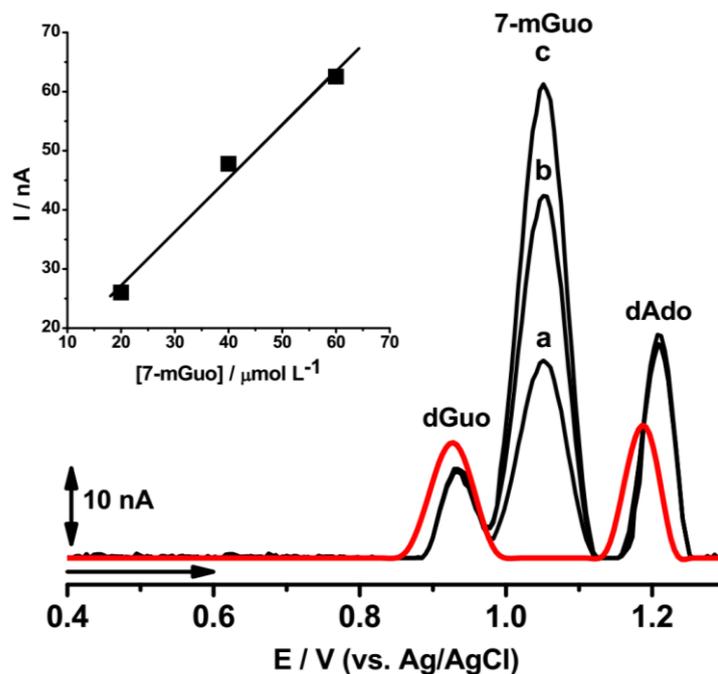


Na mistura 7-mGua + dsDNA, em ambos os meios investigados, o pico anódico da 7-mGua sofreu sobreposição com o pico de oxidação dos resíduos da desoxiguanosina (dGuo) do DNA, **Figura 22A e 22B**. Quando os voltamogramas foram comparados com os de dsDNA controle também foi detectada uma diminuição da corrente de pico dos resíduos da desoxiadenosina (dAdo), tanto no meio ácido quanto no fisiológico, **Figuras 22A e 22B**.

Na mistura 7-mGuo + dsDNA no tampão acetato, **Figura 22C**, apenas dois picos foram detectados, demonstrando que há sobreposição do pico de oxidação da 7-mGuo com o pico de oxidação dos resíduos da dAdo do dsDNA, percebe-se

também, quando comparado com o controle do DNA, que a largura e a corrente do pico da dAdo aumentaram significativamente, **Figura 22C**. Contudo, em meio fisiológico os voltamogramas apresentaram três picos de oxidação, esses quando comparados com o controle percebe-se que existe discriminação entre os potenciais da dGuo, 7-mGuo e dAdo. Uma vez que o pH = 7,2 é o que melhor separa as correntes de pico. Adições da 7-mGuo foram realizadas na solução e uma curva analítica foi levantada, **Figura 23**.

Figura 23. DPV do (—) dsDNA 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ controle e do (—) dsDNA 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + (a) 20, (b) 40 e (c) 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 7-mGuo. Tampão fosfato, pH = 7,2, $v = 5\text{mV s}^{-1}$.



Os DPVs, **Figura 23**, detectaram três picos anódicos, os quais foram associados à oxidação do DNA, $E_{pa} = 0,91\text{ V}$ e $E_{pa} = 1,18\text{ V}$ e com a oxidação da 7-mGuo em $E_{pa} = 1,03\text{ V}$, demonstrando que nesta condição experimental não ocorreu a sobreposição do pico anódico da 7-mGuo com os picos anódicos do dsDNA e que ambos os processos eletroquímicos foram detectados sem quaisquer interferência. Também foi possível verificar um aumento linear da corrente de pico de oxidação da 7-mGuo em função da sua concentração (20, 40 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$), com um coeficiente de correlação 0,988, **Figura 23 (inserida)**, demonstrando assim a possibilidade da detecção e quantificação eletroanalítica da 7-mGuo na presença da molécula de dsDNA.

Todos esses resultados voltamétricos demonstram a possibilidade da detecção da metilação da Gua utilizando DPV, uma vez que as alterações no perfil voltamétrico da Gua em relação aos seus derivados metilados ocorrem, tanto no meio ácido como no fisiológico, **Figuras 22 e 23**. Essas alterações do perfil voltamétrico da Gua podem ser possivelmente associadas à metilação dos ácidos nucleicos, após uma possível interação com o fármaco/droga investigado. Assim, uma nova e importante aplicação da eletroquímica para detecção da metilação da Gua utilizando voltametria de pulso diferencial foi desenvolvida e proposta.



CAPÍTULO 5. Reações redox dos biomarcadores orto-tirosina e 3-nitro-tirosina: um estudo comparativo com a para-tirosina



5.1. Mecanismo redox da *para*-tirosina, *orto*-tirosina e da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo: um estudo comparativo

Neste capítulo o comportamento eletroquímico dos isômeros *p*-Tyr e *o*-Tyr, bem como da 3-NO₂-Tyr, em soluções aquosas, foram investigados, em uma ampla faixa de pH (ácido, neutro e alcalino), utilizando GCE (1,6 e 3,0 mm) e diferentes técnicas eletroquímicas tais como, CV, DPV, SWV e EIS. Por fim, os dados experimentais eletroquímicos da *p*-Tyr, *o*-Tyr e da 3-NO₂-Tyr foram analisados e comparados e os respectivos mecanismos de oxidação propostos.

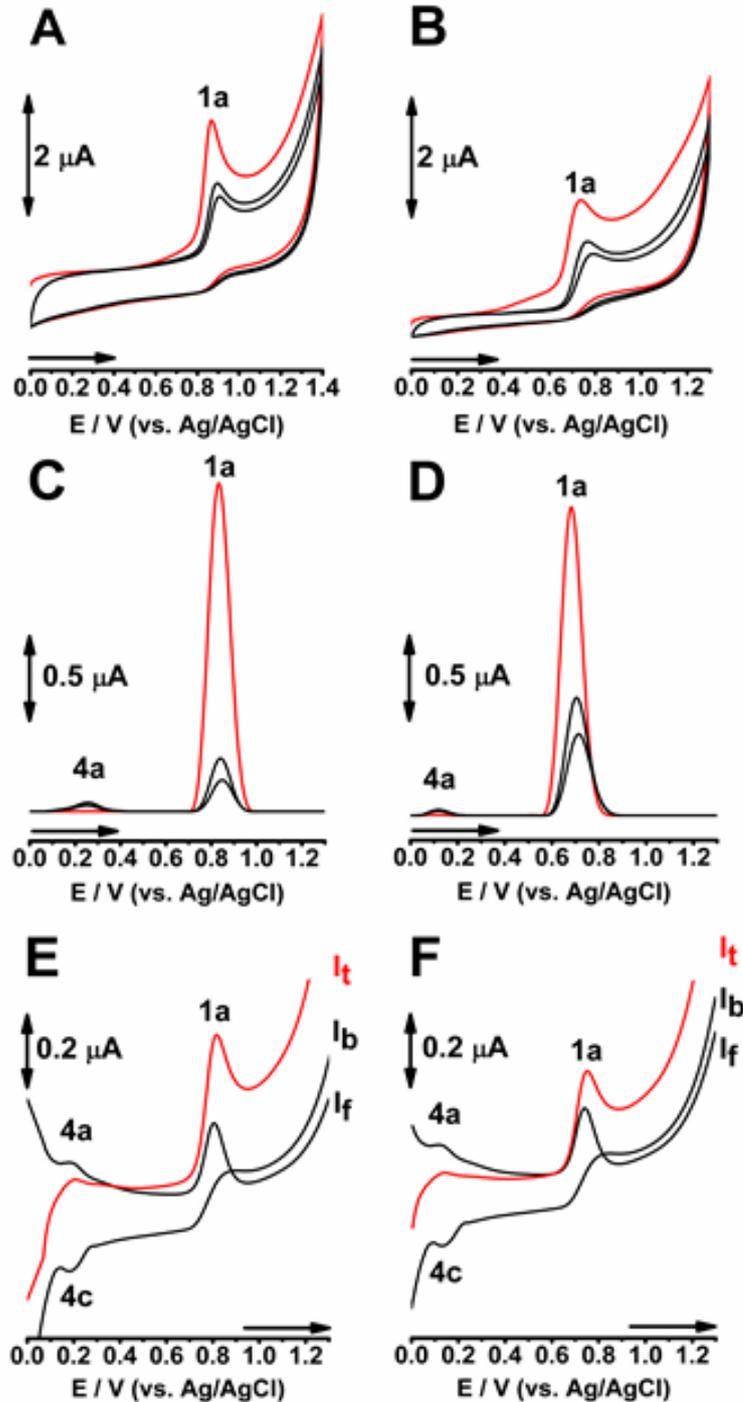
5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Mecanismo de oxidação da *p*-Tyr

O mecanismo de oxidação da *p*-Tyr em meio aquoso (pH = 4,5 e 7,0) e GCE (1,6 mm), foi investigado usando CV, DPV e SWV, **Figuras 24A-F**. Todos os voltamogramas da *p*-Tyr, foram bem semelhantes e detectaram apenas um único pico anódico irreversível 1a, relacionado à oxidação do grupo fenólico da *p*-Tyr, em $E_{p1a} \sim 0,83$ V em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 4,5), **Figuras 24A, 24C e 24E**, e em $E_{p1a} \sim 0,68$ V em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,0), **Figuras 24B, 24D e 24F**. Pelos valores dos potenciais do pico 1a esses resultados demonstram claramente que a retirada do elétron, ocorre mais facilmente em meio neutro. Além disso, a segunda e a terceira varredura de potencial por DP e SW realizadas em soluções da *p*-Tyr, 100 μmol L⁻¹, **Figuras 24C-F**, detectaram uma diminuição bem significativa da corrente de pico 1a, causada pela adsorção dos produtos de oxidação da *p*-Tyr na superfície do GCE, bem como detectaram um pequeno pico anódico reversível 4a, em $E_{p4a} \sim +0,25$ V em pH = 4,0 e em $E_{p4a} \sim +0,11$ V em pH = 7,0, que por sua vez está associado à oxidação de um produto de oxidação da *p*-Tyr eletroativo, de acordo com estudos anteriores da literatura sobre a eletro-oxidação da *p*-Tyr em meio neutro e por DPV (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011).

Os experimentos CV, DPV e SWV realizados acima foram repetidos em soluções aquosas de *p*-Tyr 50 μmol L⁻¹ em meio ácido e neutro e utilizando um GCE (3,0 mm) e os resultados foram qualitativamente semelhantes aos da **Figura 24**. No entanto, nos voltamogramas DP e SW sucessivos, apenas o pico 1a foi identificado.

Figura 24. Voltamogramas sucessivos de CV, DP e SW de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ *p*-Tyr em tampão acetato (**A, C e E**), pH = 4,5 e (**B, D e F**) tampão fosfato, pH = 7,0. (**A-D**) Primeiro e (**E-F**) segunda varredura (—). I_t - corrente total, (—) I_f - corrente direta e (—) I_b - corrente reversa. CV e SWV a 50 mV s^{-1} e DPV a 5 mV s^{-1} .



Então, considerando os resultados anteriores da literatura (CAO et al., 2018; ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011; TEIXEIRA et al., 2016; TOPKAYA et al., 2018; TOPKAYA; CETIN; OTLES, 2018) e os dados voltamétricos da **Figura 24**, o pico anódico 1a é associado com a oxidação do grupo fenólico da *p*-Tyr, com a retirada

de um elétron e um próton, para formação do radical altamente reativo fenóxi (p -Tyr \cdot), que pode reagir quimicamente via polimerização e/ou com a água para formar um o -derivado de quinona (pico 4c/4a). Entretanto, os resultados eletroquímicos apresentados demonstram que a via de polimerização é predominante, considerando dois pontos importantes, a baixa intensidade da corrente do pico 4a e a forte adsorção na superfície do GCE de produtos não eletroativos, desde que uma queda significativa da corrente do pico 1a já a partir da segunda varredura de potencial foi observada. Estes resultados eletroquímicos de p -Tyr serão comparados com os obtidos para o -Tyr e 3-NO₂-Tyr nas Seções 5.2.2 e 5.2.3, estabelecendo as diferenças de reatividade entre essas espécies. Além disso, possivelmente auxiliarão na interpretação de mecanismos *in-vivo* associados com essas moléculas.

5.2.2 Mecanismo de oxidação da o -Tyr

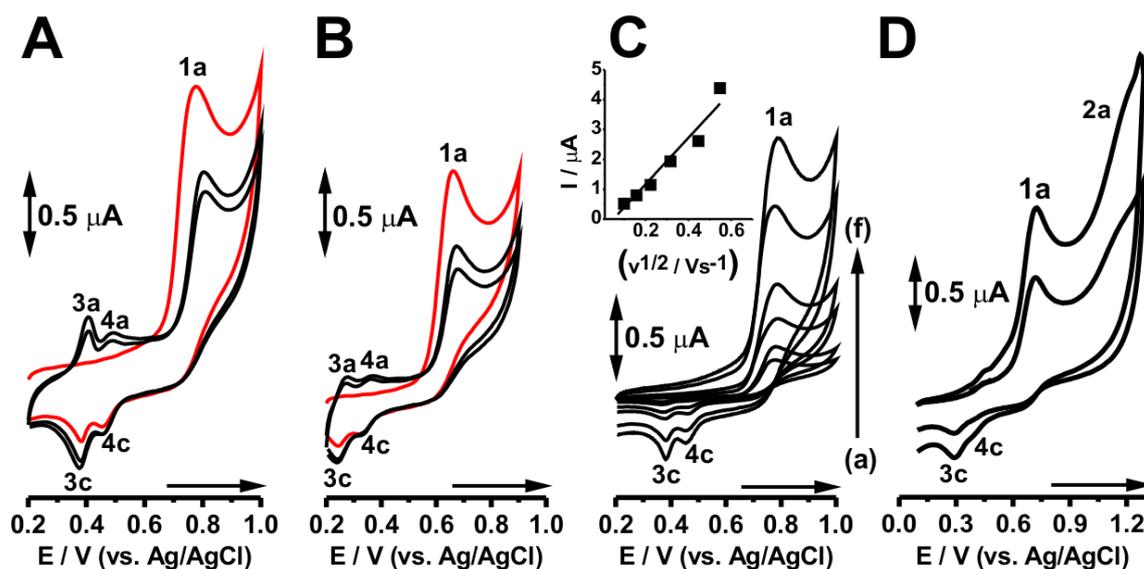
5.2.2.1 Voltametria Cíclica

Pela primeira vez na literatura, o mecanismo de oxidação da o -Tyr no GCE foi investigado usando técnicas eletroquímicas voltamétricas. A oxidação da o -Tyr no GCE (1,6 mm) foi então primeiro investigada por CV na faixa de potencial de + 0,2 V a + 1,0 V, numa velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, em soluções aquosas de o -Tyr 100 μmol L⁻¹ preparadas em diferentes meios, com diferentes valores de pH, em tampão acetato (pH = 4,5) e em tampão fosfato (pH = 7,0), **Figura 25A e B**.

Os voltamogramas cíclicos sucessivos da o -Tyr em meio ácido, **Figura 25A e Tabela 4**, detectaram na primeira varredura, no sentido positivo, o pico anódico **1a**, em $E_{p1a} = + 0,77$ V, associado à oxidação do grupo fenólico da o -Tyr, **Esquema 2**. Já no sentido reverso ainda da primeira varredura de potencial, foram claramente identificados dois picos catódicos, pico 4c em $E_{p4c} = + 0,46$ V e pico 3c em $E_{p3c} = + 0,40$ V. Na segunda varredura, na direção positiva, três picos de oxidação foram observados, pico 3a em $E_{p3a} = + 0,37$ V, pico 4a em $E_{p4a} = + 0,43$ V e, como esperado, o pico 1a no $E_{p1a} = + 0,78$ V. O aparecimento dos picos 3a e 4a demonstrou a reversibilidade dos processos catódicos 3c e 4c e pelas diferenças $| E_{p3a} - E_{p3c} | = 30$ mV e $| E_{p4a} - E_{p4c} | = 30$ mV, que essas reações ocorrem com a retirada de dois elétrons, 1.3.5 (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011) Esses resultados são qualitativamente bem similares aos da oxidação da molécula do fenol na superfície do GCE (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011), indicando

evidentemente que os picos redox 3c / 3a e 4c / 4a correspondem a dois produtos eletroativos da eletro-oxidação do grupo fenólico da *o*-Tyr, derivados de *o*- e *p*-quinonas que são reversivelmente reduzidos na superfície do eletrodo, **Esquema 2**.

Figura 25. CVs sucessivos de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ *o*-Tyr em (A) tampão acetato, pH = 4,5 e (B) tampão fosfato, pH = 7,0. (—) Primeiro registrado, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (C) CVs de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ *o*-Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0 sob diferentes taxas de varredura (10, 20, 50, 100, 250, 500 e 1000 mV s^{-1}).



Os voltamogramas cíclicos sucessivos registrados em uma solução aquosa da *o*-Tyr 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em meio neutro, em tampão fosfato, pH = 7,0, **Figura 25 e Tabela 4**, identificaram o pico anódico irreversível 1a, em $E_{p1a} = + 0,66 \text{ V}$, e dois picos catódicos reversíveis, pico 3c em $E_{p3c} = + 0,27 \text{ V}$ e pico 4c em $E_{p4c} = + 0,36 \text{ V}$. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em meio ácido (pH = 4,5), **Figura 25**, mas em pH = 7.0 todos os processos redox, 1a, 3c / 3a e 4c / 4a, foram deslocados para valores de potenciais mais negativos, indicando que todas essas reações redox ocorrem com retirada de elétrons e com participação de prótons, como esperado no geral para moléculas orgânicas (CLAYDEN et al., 2000), o qual os processos anódicos ocorrem mais facilmente em pHs mais elevados, uma vez que os elétrons estão mais disponíveis e são mais facilmente retirados pela superfície do eletrodo de trabalho.

Tabela 4. Potenciais de oxidação/redução da *p*-Tyr, *o*-Tyr and 3-NO₂-Tyr na CV em GCE.

| TIROSINAS | Valores dos Potenciais na voltametria cíclica (V vs. Ag/AgCl) | |
|--------------------|---|------------------------------|
| | pH = 4.5 | pH = 7.0 |
| <i>p</i> -Tirosina | $E_{p1a} = + 0.83 \text{ V}$ | $E_{p1a} = + 0.68 \text{ V}$ |
| | $E_{p2a} = -$ | $E_{p2a} = -$ |
| | $E_{p3a} = -$ | $E_{p3a} = -$ |
| | $E_{p3c} = -$ | $E_{p3c} = -$ |
| | $E_{p4a} = -$ | $E_{p4a} = -$ |
| | $E_{p4c} = -$ | $E_{p4c} = -$ |
| <i>o</i> -Tirosina | $E_{p1a} = + 0.77 \text{ V}$ | $E_{p1a} = + 0.66 \text{ V}$ |
| | $E_{p2a} = -$ | $E_{p2a} = + 1.12 \text{ V}$ |
| | $E_{p3a} = + 0.37 \text{ V}$ | $E_{p3a} = + 0.25 \text{ V}$ |
| | $E_{p3c} = + 0.40 \text{ V}$ | $E_{p3c} = + 0.27 \text{ V}$ |
| | $E_{p4a} = + 0.43 \text{ V}$ | $E_{p4a} = + 0.33 \text{ V}$ |
| | $E_{p4c} = + 0.46 \text{ V}$ | $E_{p4c} = + 0.36 \text{ V}$ |
| 3-nitro-tirosina | $E_{p1a} = + 0.95 \text{ V}$ | $E_{p1a} = + 0.86 \text{ V}$ |
| | $E_{p2a} = + 1.20 \text{ V}$ | $E_{p2a} = + 1.13 \text{ V}$ |
| | $E_{p3a} = -$ | $E_{p3a} = -$ |
| | $E_{p3c} = -$ | $E_{p3c} = -$ |
| | $E_{p4c} = -$ | $E_{p4c} = -$ |

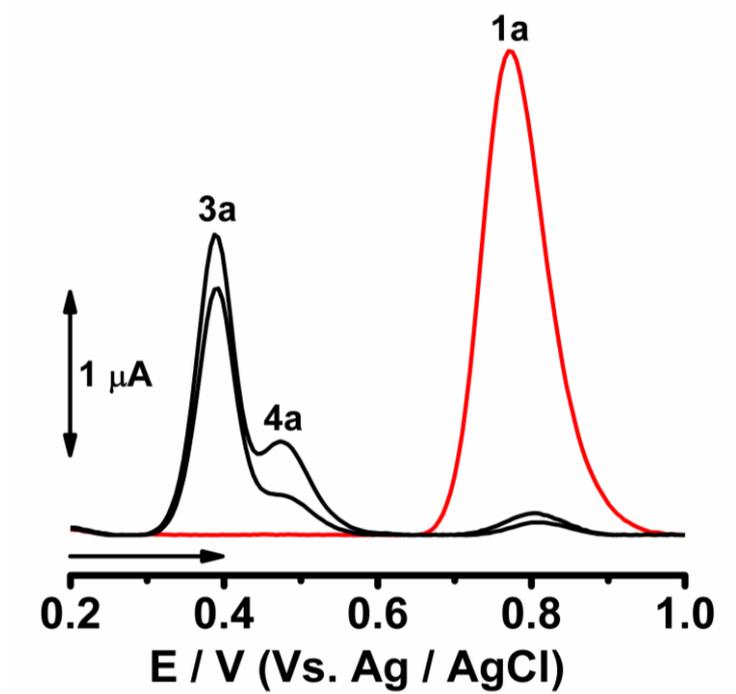
A influência da velocidade de varredura na oxidação do *o*-Tyr também foi examinada por CV, no GCE (1,6 mm). O GCE foi então submerso numa solução de *o*-Tyr 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparada em tampão acetato, pH = 4,5, e os voltamogramas registrados para diferentes velocidades de varredura (5 - 200 mV s^{-1}), **Figura 25C**. O eletrodo foi sempre polido entre as medições, para evitar problemas de adsorção de produtos de oxidação *o*-Tyr na sua superfície. Os resultados indicaram que, aumentando a velocidade de varredura da CV, a corrente do pico 1a, associado com a oxidação do grupo fenólico da *o*-Tyr, aumenta linearmente com a raiz quadrada da

velocidade de varredura da CV, com um coeficiente de correlação de $r = 0,996$, **Figura 25C**, e que conseqüentemente, pela equação de Randles para processos redox irreversíveis difusionais, *Seção 1.3.1*, que o transporte de massa da *o*-Tyr para a superfície do eletrodo é governado predominantemente por difusão (BARD; FAULKNER, 2001), Por último, um voltamograma cíclico na faixa de potencial de + 0,2 V a + 1,3 V, a uma velocidade de varredura de 250 mV s^{-1} , foi registrado na solução de *o*-Tyr $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, **Figura 25D e Tabela 1**, e como esperado, os picos 1a, 3c e 4c foram todos detectados. No entanto, um novo processo anódico 2a foi identificado, em $E_{p2a} = + 1,12 \text{ V}$, o qual foi associado à oxidação do radical *o*-Tyr[•], diretamente na superfície do GCE, para formar um produto final catiônico (JIANG et al., 2010), **Esquema 2**.

5.2.2.2 Voltametria de Pulso Diferencial

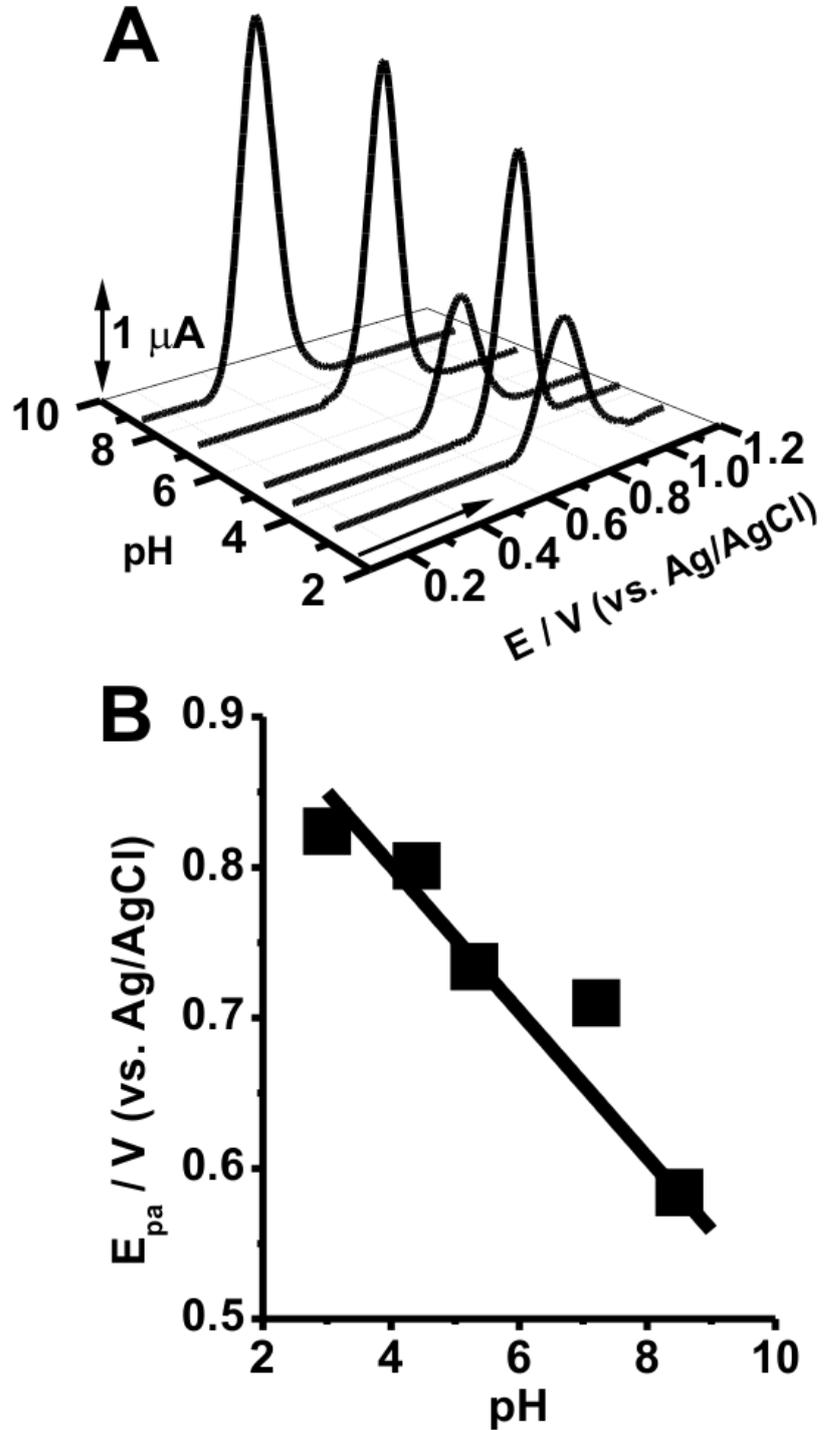
Os voltamogramas de DP sucessivos foram realizados em uma solução de *o*-Tyr $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$, em GCE (3,0 mm), **Figura 26**. O pico de oxidação 1a da *o*-Tyr apareceu em $E_{p1a} = + 0,77 \text{ V}$. Na segunda varredura, ocorreram dois novos picos 3a e 4a (com altas correntes), pico 3a em $E_{p3a} = + 0,38 \text{ V}$ e pico 4a em $E_{p4a} = + 0,46 \text{ V}$. Esses novos processos anódicos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação da *o*-Tyr, **Esquema 2**. Todos esses resultados de voltametria de DP estão de acordo com os dados de CV realizados na GCE (1,6 mm), **Figura 25A**. Além disso, os voltamogramas de DP, **Figura 26**, detectaram uma queda bem significativa da corrente do pico 1a já a partir da segunda varredura de potencial, possivelmente devido à diminuição da área da superfície ativa do GCE disponível, causada por produtos derivados de *o*- e *p*-quinona adsorvidos, em concordância com os resultados do espectroscopia de impedância, *Seção 5.4*. Essas experiências de DPV foram repetidas em uma solução de *o*-Tyr $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando um GCE (1,6 mm) e os resultados foram muito semelhantes aos da **Figura 26**.

Figura 26. DPV sucessivos de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ *o*-Tyr em tampão acetato, pH = 4,5. (—) Primeira varredura, $v = 5\text{mVs}^{-1}$



A oxidação da *o*-Tyr em GCE (1,6 mm) foi investigada em uma faixa de pH entre 3,0 e 9,0 usando DPV, **Figura 27A e 27B**. Em todos os pHs, na primeira varredura de potencial a eletro-oxidação da *o*-Tyr ocorreu em uma única etapa, associada à oxidação do grupo fenólico (pico 1a), com forte influência do pH (potencial e corrente), **Figura 27A e 27B**. Os resultados estabeleceram uma dependência linear do potencial do pico 1a com o pH, com uma relação de $E_{p1a} \text{ (V)} = 0,962 - 52\text{mV/pH}$, **Figura 27B**, e que no geral a largura na meia altura do pico anódico foi de $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$, indicando assim que a oxidação da *o*-Tyr em GCE, em meio aquoso, ocorre com a retirada de um elétron e um próton, **Seção 1.3.1, Esquema 2**. Os resultados da **Figura 27** também mostraram que a corrente do pico 1a tem valores máximos em tampão fosfato, na faixa de pH = 7,0 - 8,0.

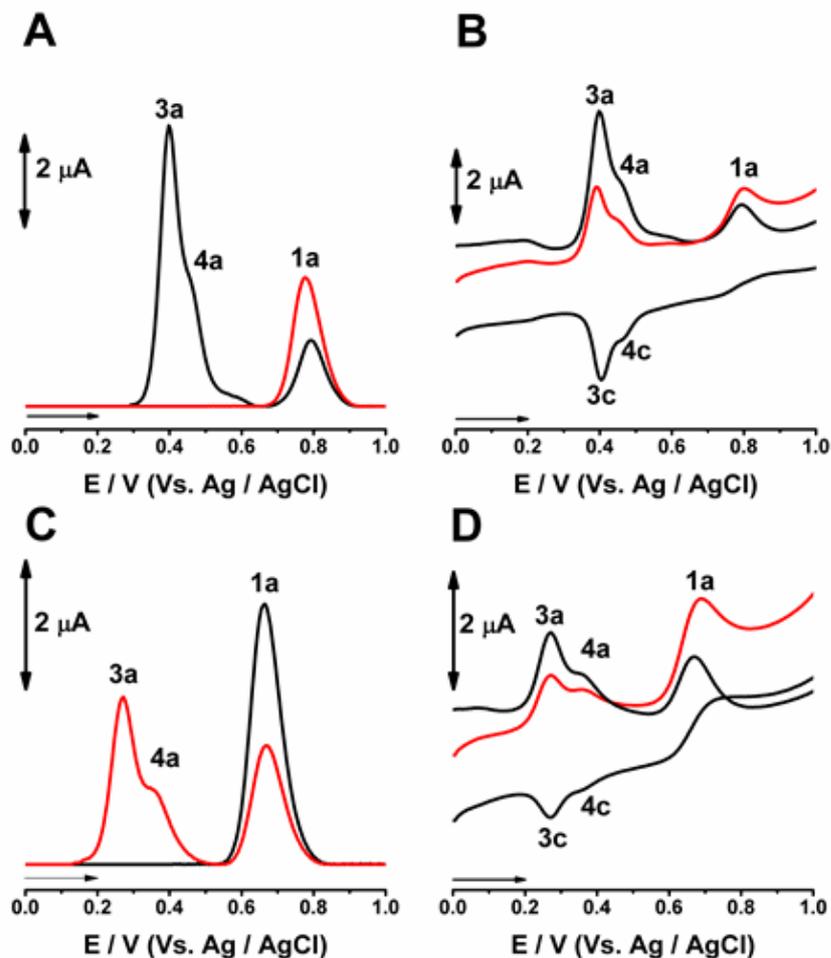
Figura 27. (A) gráfico 3D de voltamogramas DP de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ *o*-Tyr versus pH, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (B) gráfico de E_{pa} vs. pH.



5.2.2.3 Voltametria de Onda Quadrada

O mecanismo de oxidação de *o*-Tyr foi investigado usando SWV em GCE (3,0 mm), **Figura 28**. Observa-se que os voltamogramas sucessivos de SW registrados em solução aquosa contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *o*-Tyr apresenta os mesmos processos caracterizados pelas técnicas de CV e DP em pH = 4,5, **Figuras 28A e 28B** e 7,0, **Figuras 28C e 28D**. Na primeira varredura, o pico 1a é observado em $E_{p1a} = 0,77 \text{ V}$ em pH = 4,5, **Figuras 28A e 28B**, e $E_{p1a} = 0,66 \text{ V}$ em pH 7,0, contudo, na segunda varredura de potencial, dois novos picos anódicos reversíveis são revelados em pH 4,5, pico 3a em $E_{p3a} = 0,39 \text{ V}$ e 4a em $E_{p4a} = 0,45 \text{ V}$ **Figuras 28A e 28B** e $E_{p3a} \pm 0,29 \text{ V}$ e pico 4a no $E_{p4a} \pm 0,35 \text{ V}$, **Figuras 28C e 28D**, em pH 7,0.

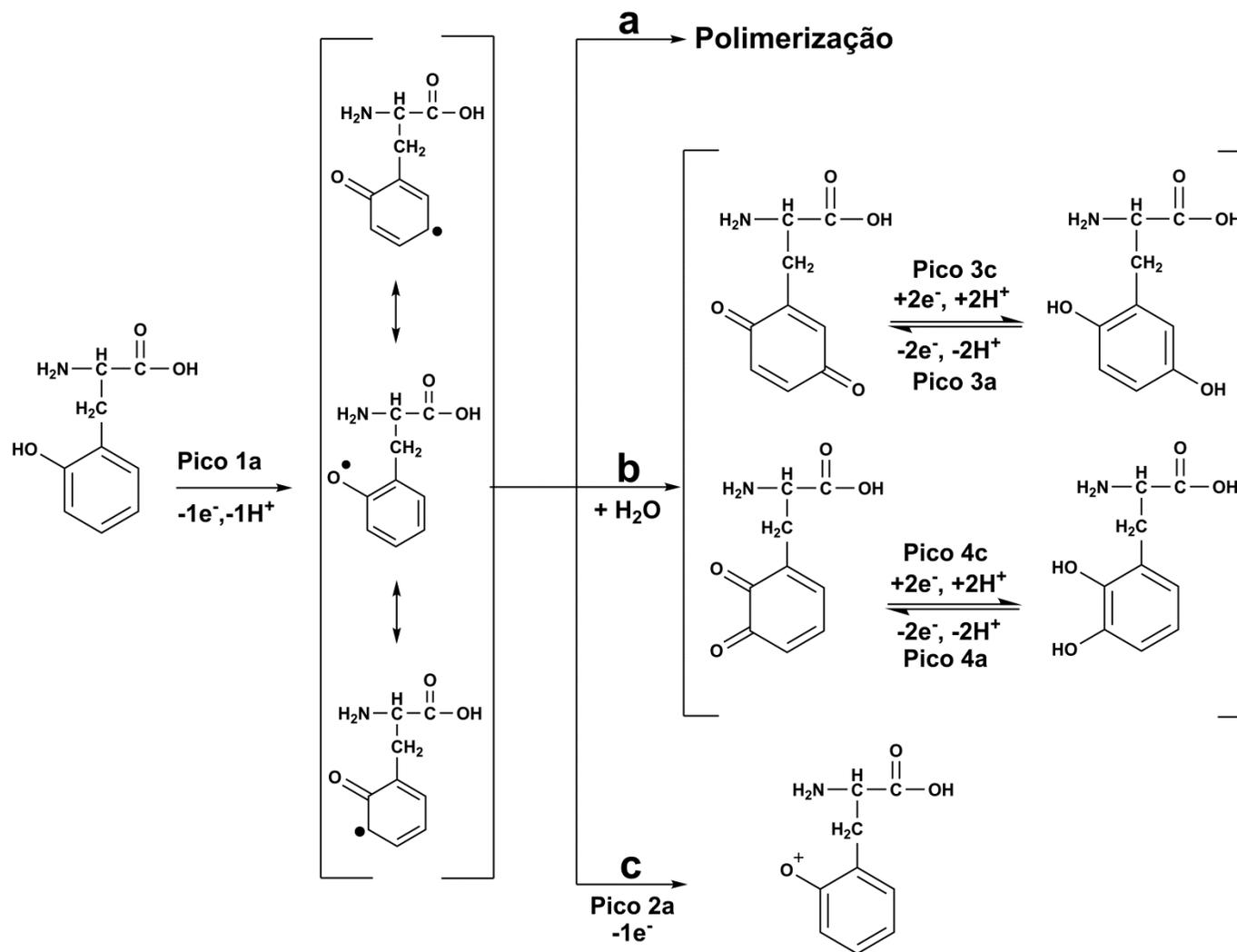
Figura 28. SWVs de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ *o*-Tyr em pH = 7,2. (A) Primeira varredura e (B) segunda varredura. (—), I_t - corrente total, (—) I_f corrente direta e (—) I_b - corrente reversa, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$



5.2.2.4 Mecanismo de Oxidação da *orto*-Tirosina

Esses experimentos voltamétricos demonstraram que o mecanismo de oxidação de *o*-Tyr, **Figuras 25-29** e **Esquema 2**, ocorre no grupo fenólico (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011; NASCIMENTO et al., 2019; REYNAUD; MALFOY, 1980; SEQUARIS et al., 1977), com um equilíbrio ácido-base associado, com a retirada de um elétron e um próton formando *o*-Tyr[•] radical (pico 1a), que no meio aquoso pode reagir por três caminhos: **a)** polimerização, **b)** com água formando derivados eletroativos de quinonas (picos 3c/3a e 4c/4a) e/ou **c)** sendo oxidado eletroquimicamente (pico 2a). Estes resultados são qualitativamente semelhantes aos da oxidação de fenol na superfície do GCE (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011). Além disso, quando os dados eletroquímicos da *o*-Tyr, **Figuras 25-29**, são comparados com os da *p*-Tyr, a maior reatividade da *o*-Tyr é evidente, especialmente o radical *o*-Tyr[•] com água para produzir derivados de quinonas eletroativos, uma vez que, diferentemente da *p*-Tyr, sua estrutura permite a formação de um derivado de *p*-quinona, bem como um de *o*-quinona, que são ambos reversíveis e reduzidos na superfície do GCE como pode ser observado no **Esquema 2**.



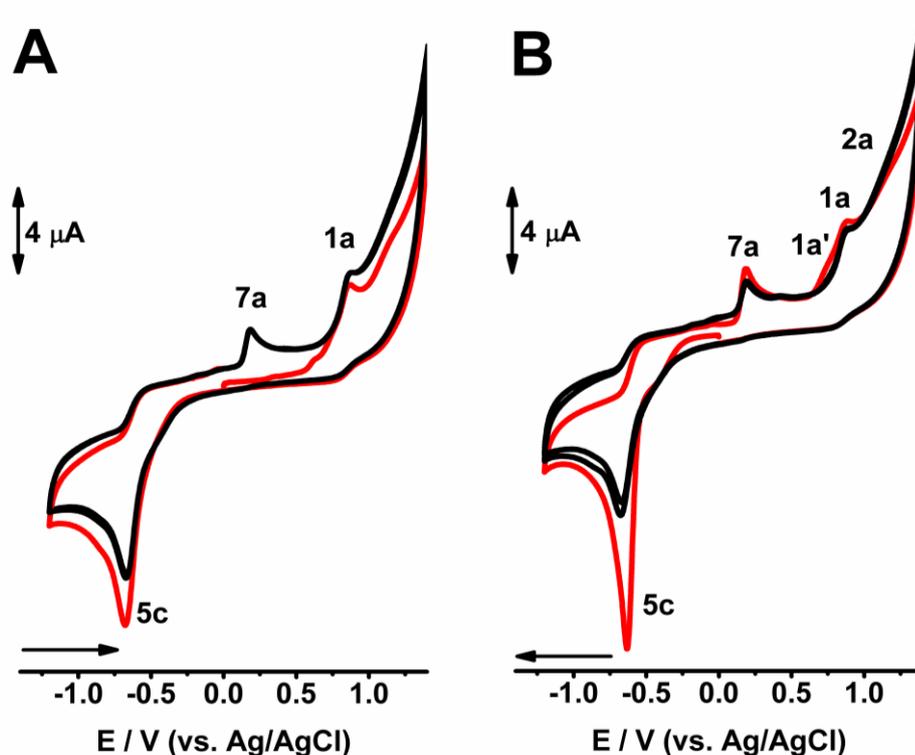
Esquema 2. Mecanismo de oxidação proposto para *o*-Tyr.

5.2.3 Mecanismo redox da 3-nitro-tirosina

Similarmente a *p*-Tyr e a *o*-Tyr o mecanismo redox da 3-NO₂-Tyr foi investigado em GCE. Inicialmente, diferentes solventes foram avaliados para a preparação da solução estoque da 3-NO₂-Tyr. Sua solubilidade foi verificada em água deionizada, álcool etílico PA, tampão acetato, pH = 4,5, e em tampão fosfato, pH = 7,5. Os resultados demonstraram que a 3-NO₂-Tyr é solúvel em tampão fosfato, pH = 7,0, assim, este eletrólito suporte foi utilizado para a preparação da solução estoque da 3-NO₂-Tyr 500 μmol L⁻¹

O comportamento redox da 3-NO₂-Tyr foi inicialmente investigado utilizando a CV numa solução recém-preparada de 3-NO₂-Tyr 500 μmol L⁻¹ em tampão fosfato, pH = 7,0, saturada com N₂, **Figura 29**.

Figura 29. CVs sucessivos da 3-NO₂-Tyr 500 μmol L⁻¹ em tampão fosfato, pH = 7,2, saturada com N₂, (A) Varredura direção ânódica e (B) Varredura direção catódica, (—) primeira varredura.



A **Figura 29B** apresenta os voltamograma cíclico obtido na solução da 3-NO₂-Tyr, partindo de $E_i = 0,00$ V na direção catódica e registrado na janela de potencial de -1,1 V até + 1,3 V, a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. No voltamograma foram identificados vários processos redox, um ombro, em $E_{p1a'} = \sim$

0,70 V, e 2 picos anódicos, em $E_{p1a} = 0,85$ V e $E_{p2a} = 1,11$ V, que estão associados com vários processos de oxidação possíveis de ocorrer na molécula. Observa-se também que o pico 7a ($E_{p7a} = 0,18$ V) está associado ao processo catódico 5c ($E_{p6c} = -0,63$ V), uma vez que quando esses voltamogramas são registradas a partir da direção anódica este processo não foi identificado, **Figura 29A**.

Assim considerando a complexidade desses resultados os processos de oxidação e redução da 3-NO₂-Tyr foram analisados em separado, onde primeiramente foi investigada os processos de oxidação e posteriormente os de redução, em GCE.

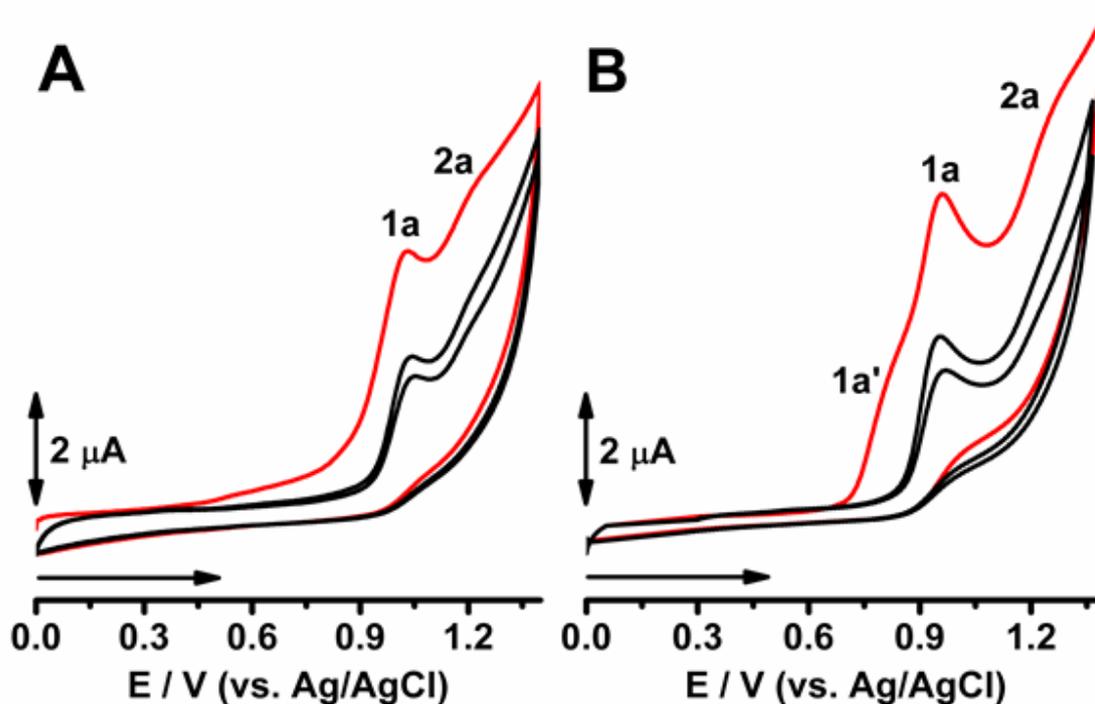
5.2.3.1 Mecanismo de Oxidação da 3-nitro-Tirosina

5.2.3.1.1 Voltametria Cíclica

O comportamento de oxidação da 3-NO₂-Tyr foi investigado sobre GCE utilizando CV, a uma velocidade de 50 mV s⁻¹, numa solução de 3-NO₂-Tyr de concentração 300 μmol L⁻¹ em tampão acetato, pH = 4,5, **Figura 30A e Tabela 1**, e em tampão fosfato, pH = 7,0, **Figura 30B e Tabela 1**. Nos voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos na solução de 3-NO₂-Tyr em meio ácido, **Figura 30A e Tabela 1**, verificou-se na primeira varredura de potencial, a presença de dois picos anódicos, pico 1a, $E_{p1a} = +1,02$ V e 2a, $E_{p2a} = +1,20$ V, associados à processos de oxidação da 3-NO₂-Tyr. Nota-se que esses picos são irreversíveis, uma vez que não foram detectados picos catódicos durante a varredura reversa. A partir da segunda varredura de potencial, possivelmente devido à adsorção de produtos de oxidação da 3-NO₂-Tyr sobre a superfície do GCE, foi detectada uma diminuição significativa da corrente do pico 1a e o completo desaparecimento do pico anódico 2a.

Nos voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos na solução de 3-NO₂-Tyr em meio fisiológico, **Figura 30B**, foram detectados 3 picos anódicos, pico 1a' em $E_{p1a'} = +0,80$ V, pico 1a, $E_{p2a} = +0,95$ V, $E_{p3a} = +1,22$ V, e a partir da segunda varredura, devido a adsorção de produtos de oxidação na superfície do GCE verifica-se uma diminuição significativa da corrente do pico 1a e o completo desaparecimento do pico 1a' e 2a.

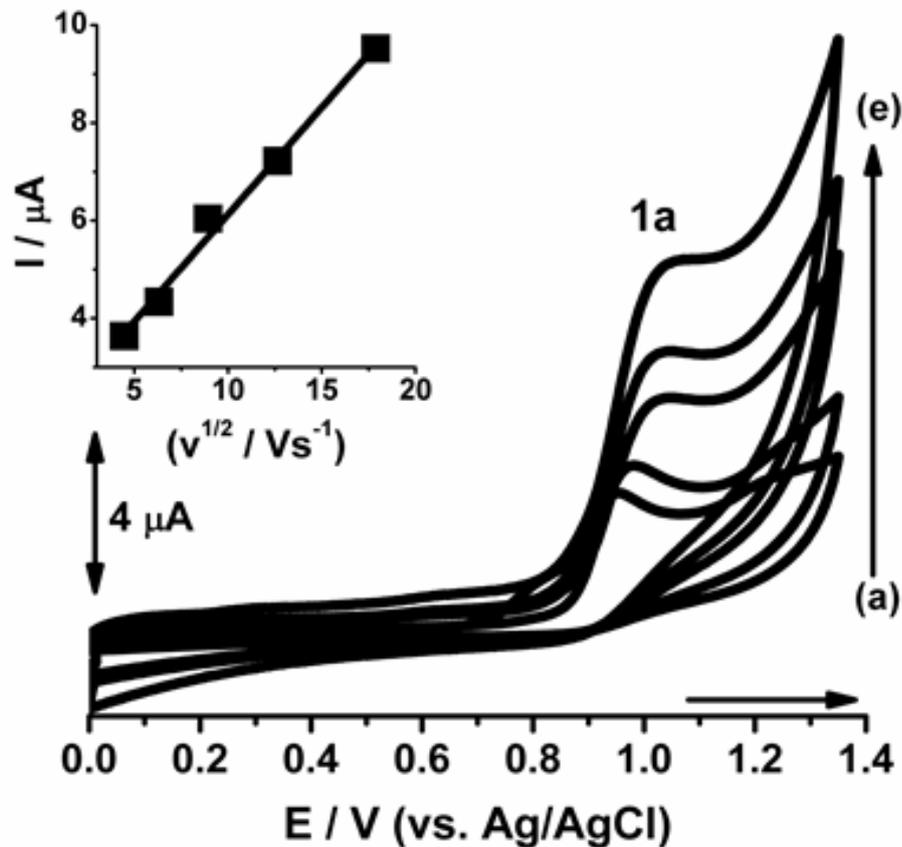
Figura 30. CVs sucessivos da 3-NO₂-Tyr 300 μmol L⁻¹ em (A) tampão acetato, pH = 4,5 e (B) tampão fosfato, pH 7,0. (—) Primeira varredura, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



A influência da velocidade de varredura sobre a corrente do pico anódico 1a da 3-NO₂-Tyr foi investigada numa solução de 3-NO₂-Tyr de concentração 300 μmol L⁻¹ preparada em eletrólito suporte tampão fosfato pH = 7,0. Os voltamogramas cíclicos foram registrados para diferentes velocidades de varredura entre 20 e 300 mV s⁻¹, **Figura 31**, e entre cada voltamograma registrado o eletrodo foi sempre limpo como explanado na seção experimental.

A **Figura 31** mostra um pequeno deslocamento do potencial do pico de oxidação 1a para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, confirmando, portanto mais uma vez a irreversibilidade deste processo. Além do mais, verificou-se que a corrente do pico 1a possui uma relação linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura, com um coeficiente de correlação de 0,9957, comportamento típico de um processo eletroquímico controlado predominantemente pelo transporte de massa difusional da espécie química eletroativa do seio da solução para a superfície do substrato eletroquímico, Seção 1.3.1, (BARD; FAULKNER, 2001).

Figura 31. CVs da 3-NO₂-Tyr 300 μmol L⁻¹ em tampão fosfato, pH = 7,0, sob diferentes velocidades de varredura (a) 20, (b) 30, (c) 50, (d) 150 e (e) 300 mV s⁻¹.



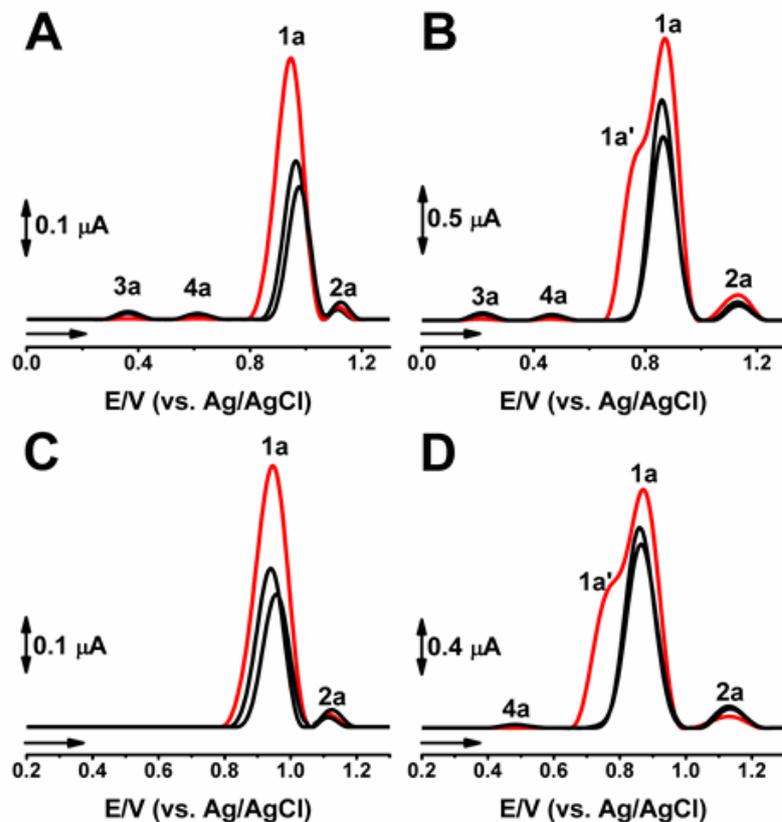
5.2.3.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial

A oxidação da 3-NO₂-Tyr foi investigada utilizando a DPV em 5 mV s⁻¹, em diferentes janelas de potenciais, na concentração de 500 μmol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suporte, tampão acetato, pH 4,5, e tampão fosfato, pH = 7,0. Inicialmente, os voltamogramas sucessivos de DP da 3-NO₂-Tyr 50 μmol L⁻¹ em tampão acetato, pH = 4,5, foram registrados entre os intervalos de potencial de + 0,0 V a + 1,3 V e + 0,20 V a + 1,3 V, **Figura 32**.

A **Figura 32A** apresenta os voltamogramas sucessivos de DP para o meio ácido e janela de potencial 0,0 V e 1,3 V, percebe-se que na primeira varredura de potencial foram detectados dois picos anódicos, o pico 1a em $E_{p1a} = + 0,99$ V, e o pico 2a, em $E_{p2a} = + 1,16$ V. Na segunda varredura, dois novos picos anódicos (com baixas correntes) são detectados, o pico 3a, em $E_{p3a} = + 0,36$ V e o pico 4a em $E_{p4a} = + 0,61$ V. O aparecimento desses novos processos possivelmente tem sua ocorrência atrelada a formação de produtos eletroativos gerados após a eletro-

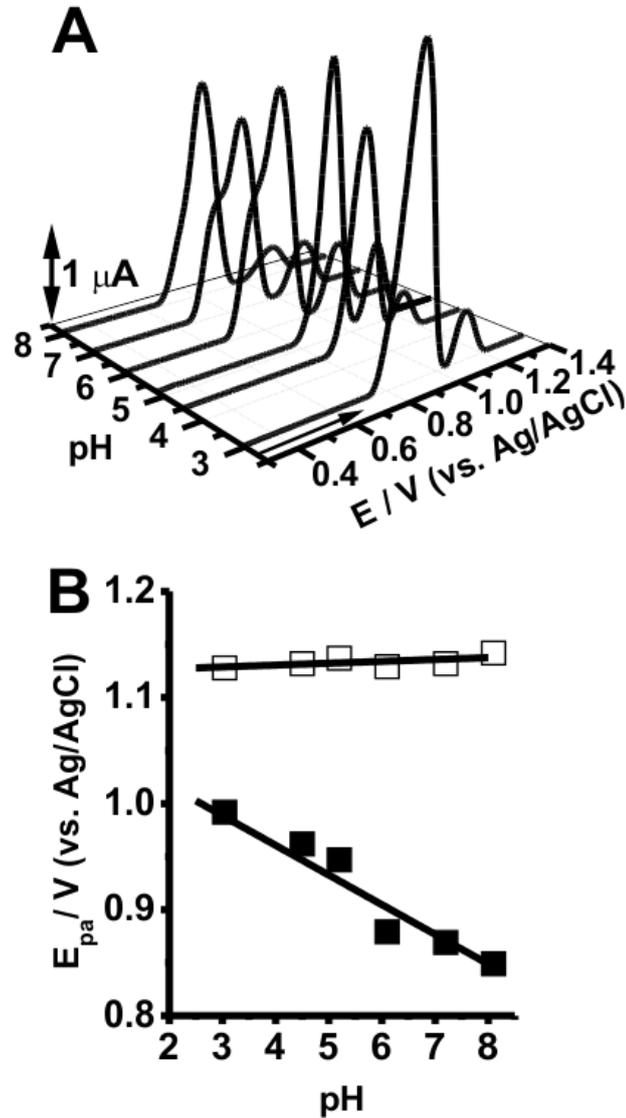
oxidação da 3-NO₂-Tyr. A ocorrência desses produtos também é uma forte indicação que possivelmente a oxidação da 3-NO₂-Tyr ocorra no grupo fenólico da molécula (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011; JIANG et al., 2010; TOPKAYA et al., 2018). Contudo, quando se verificam os voltamogramas de DP registrados na janela de potencial menor de 0,20 V a 1,3 V o evento 5a não é identificado, **Figura 32C**.

Figura 32. DPV sucessivos (com correção de linha de base) da 3-NO₂-Tyr 500 μmol L⁻¹, (**A e C**) tampão acetato pH = 4,5, (**B e D**) tampão fosfato pH = 7,0, em diferentes janelas de potenciais. (—) primeira varredura de potencial. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



Nos voltamogramas de DP da 3-NO₂-Tyr 500 μmol L⁻¹, em tampão fosfato, pH = 7,0, **Figura 32B**, registrados na janela de potencial + 0,0 V a + 1,3 V, observam-se a ocorrência de três processos anódicos para a primeira varredura de potencial, o ombro 1a' em $E_{p1a'} = + 0,74 \text{ V}$, o pico 1a de $E_{p2a} = + 0,84 \text{ V}$ e o pico 2a de $E_{p3a} = + 1,14 \text{ V}$. Na segunda varredura de potencial, dois novos picos (com baixas intensidades de corrente) foram detectados, o pico 4a, $E_{p4a} = + 0,21 \text{ V}$, e o pico 5a de $E_{p5a} = + 0,46 \text{ V}$, e foram associados aos produtos da eletro-oxidação da 3-NO₂-Tyr na superfície do GCE.

Figura 33. (A) DPVs em 3D (com correção de linha de base) da 3-NO₂-Tyr 300 μmol L⁻¹ vs. pH. **(B)** Gráfico do E_{pa} vs. pH, (■) E_{p1a} do pico 1a, (□) E_{p2a} do pico 2a.



Os resultados de oxidação em meio fisiológico foram similares ao meio ácido quando se verificou as varreduras em janela mais estreita. de + 0,20 até + 1,3 V, também são detectados três picos anódicos, o ombro anódico 1a' em E_{p1a'} = + 0,76 V, o pico 1a em E_{p1a} = + 0,87 V e por último o pico 2a em E_{p2a} = + 1,13 V. Na segunda varredura de potencial um novo pico de oxidação foi detectado, o pico 4a em E_{p4a} = + 0,48 V, **Figura 32C**. Além disso, a partir da segunda varredura de potencial foi observado o desaparecimento do pico 1a nas duas janelas de potenciais utilizadas, indicando mais uma vez uma possível adsorção dos produtos de eletro-oxidação na superfície do GCE.

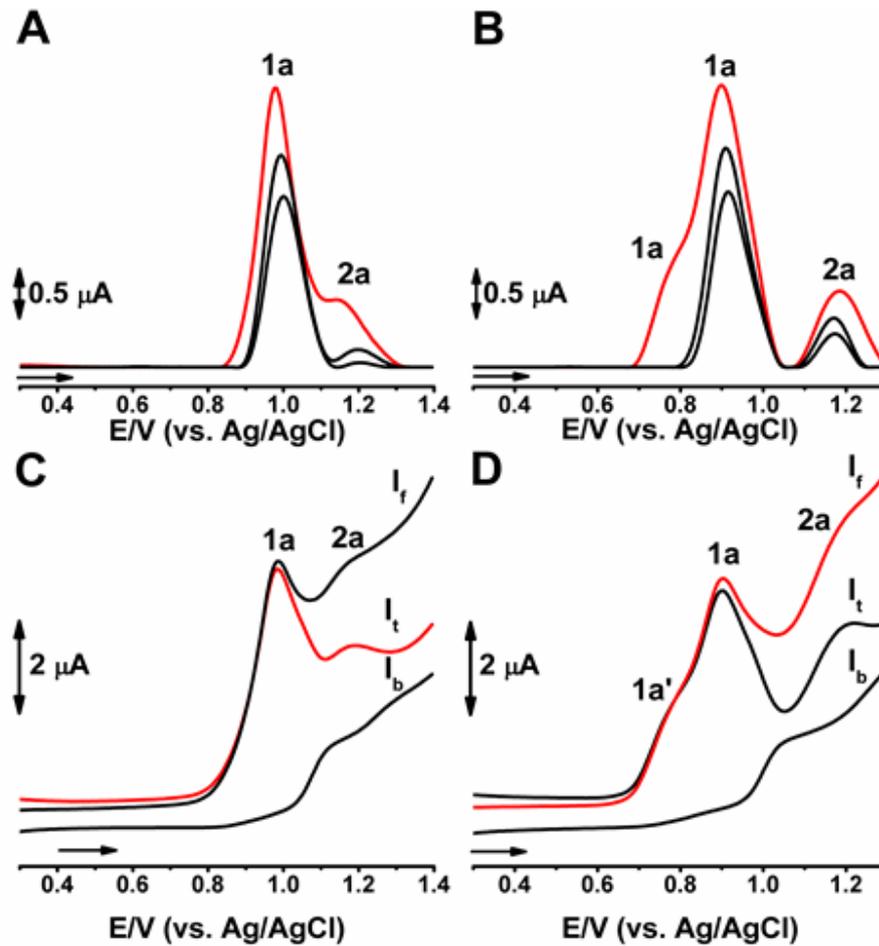
A influência do pH na oxidação do 3-NO₂-Tyr também foi investigada por voltametria DP em um amplo intervalo de pH, entre 2,0 e 8,0, com o objetivo principal de estabelecer o número de elétrons e prótons envolvidos nos processos anódicos detectados. Os DPVs, **Figura 30A**, foram todos registrados em soluções da 3-NO₂-Tyr 300 μmol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suporte, **Tabela 1**. Foi observado que o terceiro processo de oxidação da 3-NO₂-Tyr, pico 2a, é independente do pH, ocorrendo apenas com transferência de elétrons, enquanto o segundo, o pico anódico 1a, o seu potencial de pico se desloca para valores mais negativos com o aumento do pH, **Figura 33B**, demonstrando que ocorre com a transferência de elétrons e prótons.

O número de elétrons para cada processo de oxidação foi determinado utilizando a teoria da DPV, onde, para pequenas amplitudes de pulso, a largura a meia altura $W_{1/2}$ do pico de corrente é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ($W_{1/2} = 90/n$), o que permite caracterizar o mecanismo de reação de transferência de carga. O potencial do pico 2a é independente do pH, **Figuras 33A e 33B**, e considerando a sua largura de pico para meia altura de ~ 95 mV ocorre apenas com a transferência de um elétron, possivelmente associado à oxidação de um radical intermediário. Enquanto que para o pico 1a a reação de oxidação envolve a transferência de um elétron e um próton, uma vez que há uma inclinação de ~ 60 mV por unidade de pH, **Figura 33B**, e uma largura de pico para meia altura de ~ 95 mV, *Seção 1.3.1* (BARD; FAULKNER, 2001).

5.2.3.1.3 Voltametria de Onda Quadrada

A oxidação da 3-NO₂-Tryr 250 μmol L⁻¹ em GCE, em meio aquoso foi investigado por SWV, em meio ácido, pH 4,5, **Figuras 34A e 34C** e no meio neutro, pH = 7,0, **Figuras 34B e 34D**.

Figura 34. SWVs de 3-NO₂-Tyr 250 μmol L⁻¹ em **(A e C)** tampão acetato pH = 4,5 e **(B e D)** fosfato pH = 7,2. (—) Primeira varredura e I_t - corrente total, (—) I_f - corrente direta e (—) I_b - corrente reversa, $v_{ef} = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



A primeira varredura, **Figura 34A**, da SWV registrada em meio ácido detectou dois eventos anódicos, pico 1a em $E_{p1a} = + 0,97 \text{ V}$ e pico 2a em $E_{p2a} = + 1,20 \text{ V}$, e estão de acordo com resultados já verificados por CV e DPV. A irreversibilidade destes passos de oxidação da 3-NO₂-Tryr para os picos 1a e 2a foi confirmada pela representação gráfica dos componentes direto (I_f) e inverso (I_b) obtidos a partir da corrente total (I_t), **Figura 34C**. Os voltamogramas de SW da 3-NO₂-Tryr em meio

neutro, **Figura 34**, foram bem similares aqueles observados em meio ácido, entretanto um novo processo foi identificado, o ombro anódico, em $E_{p1a'} = + 0,77$ V.

5.2.3.1.4 Proposta de Mecanismo de Oxidação para a 3-nitro-Tirosina

Com base nos resultados eletroquímicos descritos e com informações já existentes na literatura sobre a oxidação de compostos fenólicos (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011; JIANG et al., 2010) foi proposto um mecanismo para a oxidação da 3-NO₂-Tyr, **Esquema 3**.

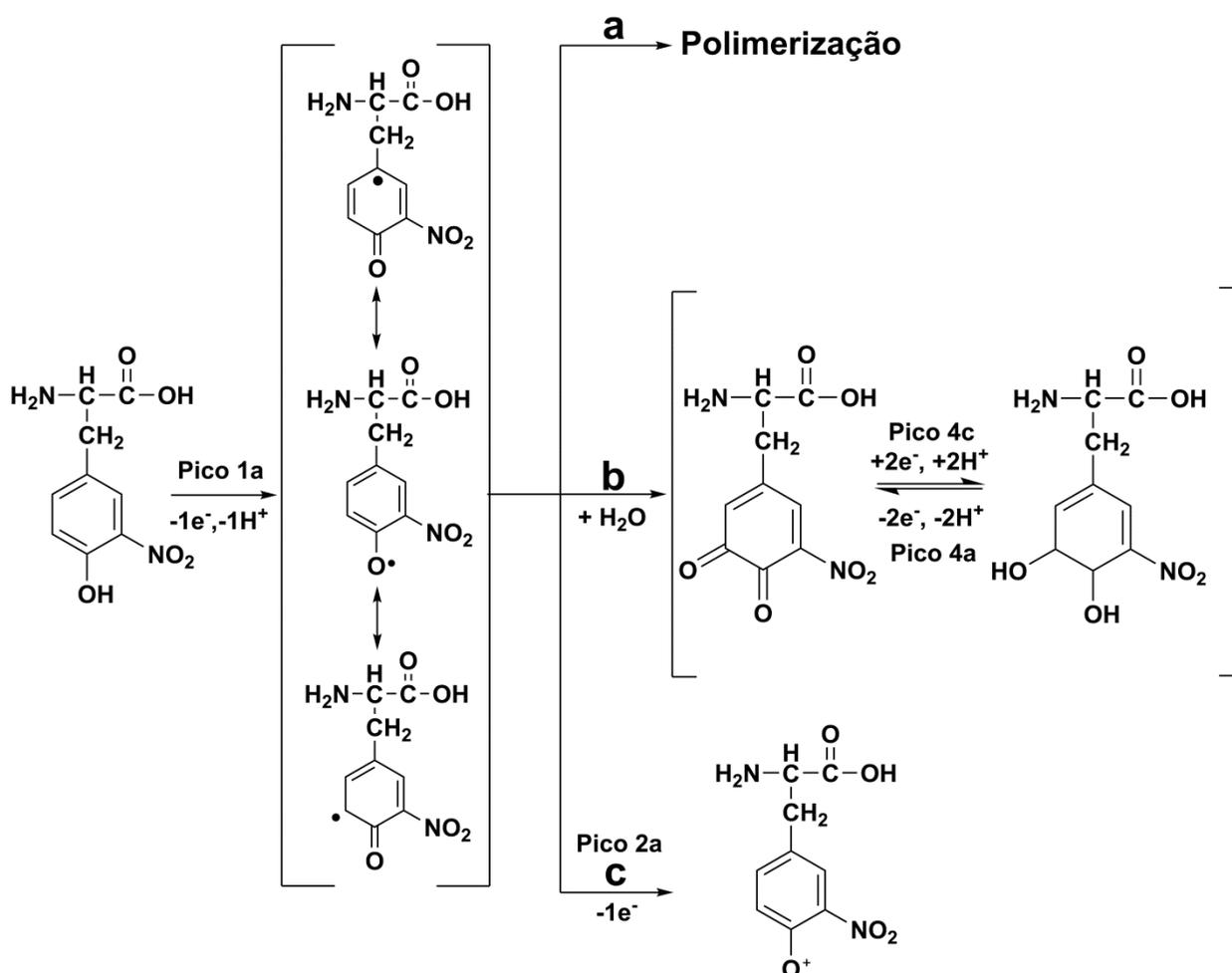
A ocorrência do ombro de oxidação 1a' apenas no meio fisiológico foi associado ao equilíbrio ácido-base do grupo fenólico da 3-NO₂-Tyr com um valor de pka ~ 7,0, provocando assim nesta condição experimental concentrações equivalentes do grupo fenólico e do fenolato (par ácido-base conjugado) (HWANG et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2019), justificando assim o aparecimentos desses dos processos quase sobrepostos.

A primeira etapa de oxidação (pico 1a) ocorre com a retirada de um elétron e um próton do grupo fenólico da 3-NO₂-Tyr, com formação de um radical fenóxi intermediário, altamente reativo, que pode reagir na solução aquosa por diferentes caminhos, **a**, **b** e **c** (**Esquema 3**). A rota **a** o radical fenóxi pode iniciar a polimerização, o que levará a produtos adsorvidos na superfície do eletrodo, essa hipótese pode ser considerada pela diminuição significativa das correntes de oxidação entre a primeira e as demais varreduras sucessivas tanto na CV quanto da DPV. A possibilidade **b** é a formação de quinonas a partir do ataque nucleofílico da água, detectada a partir dos produtos de oxidação da 3-NO₂-Tyr eletroativos, picos anódicos 3a e 4a (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011). A hipótese **c**, foi associada com a eletro-oxidação do próprio radical na superfície do GCE, com a retirada de apenas um elétron, formando um intermediário catiônico (JIANG et al., 2010), etapa essa associada ao pico de oxidação 2a.

Todas as possibilidades reacionais do radical fenóxi foram detectadas nos resultados voltamétricos, demonstrando conseqüentemente uma grande complexidade no mecanismo de oxidação da 3-NO₂-Tyr e a formação de inúmeros produtos eletroativos ou não. Além disso, o mecanismo de oxidação da 3-NO₂-Tyr proposto demonstrou claramente diferenças reacionais bem significativas quando comparado aos mecanismos da *p*-Tyr e da *o*-Tyr, **Esquemas 2 e Tabela 4**, por

exemplo a eletro-oxidação do grupo fenólico da 3-NO₂-Tyr ocorre em valores de potenciais bem mais positivos (~ 200 mV), **Tabela 4**, devido a presença do grupo nitro na molécula, já bem estabelecido na literatura com um grupo retirador de elétrons. Já em termos da reatividade do radical fenóxi o 3-NO₂-Tyr[•] foi claramente evidente sua maior tendência em polimerizar, igualmente ao radical *p*-Tyr[•]. Enquanto que o radical da *o*-Tyr[•] é bem mais reativo frente a molécula da água formando uma maior quantidade de derivados de quinonas eletroativas, **Esquema 3 e Tabela 4**.

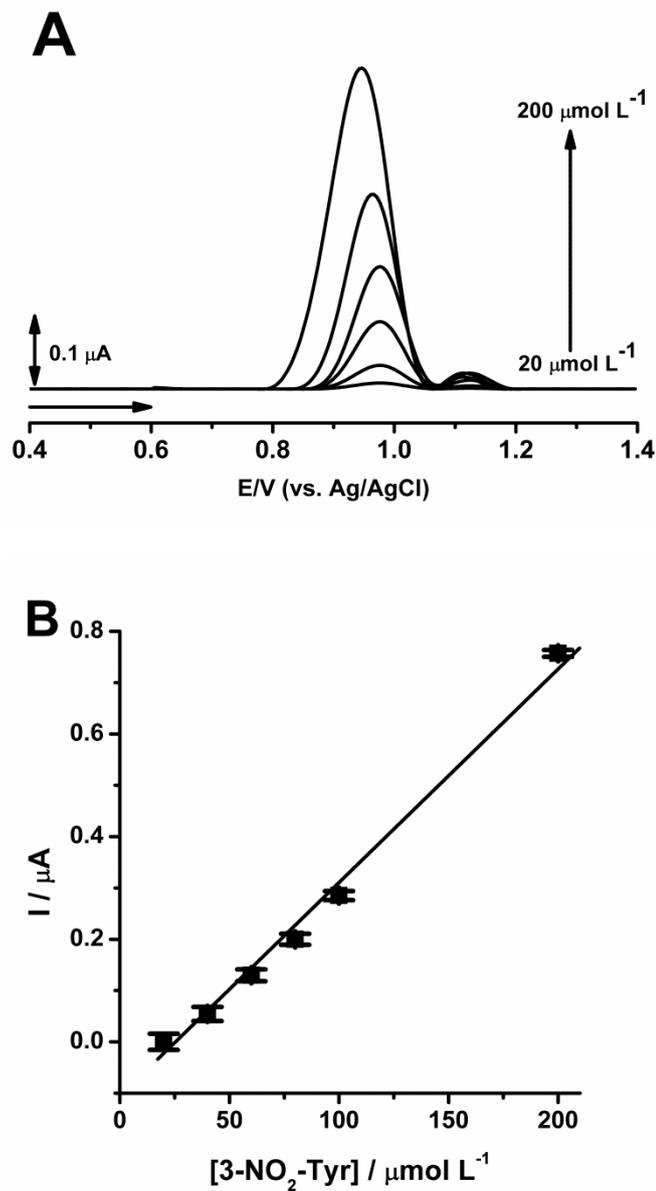
Esquema 3. Mecanismo de oxidação da 3-NO₂-Tyr proposto



5.2.4 Detecção eletroquímica da 3-nitro-tirosina

A DPV foi utilizada para quantificação eletroquímica da 3-NO₂-Tyr. Os voltamogramas de DP foram registrados em soluções de 3-NO₂-Tyr em tampão fosfato pH = 7,2 com diferentes concentrações e a variação da corrente do pico anódico 1a da oxidação da 3-NO₂-Tyr foi utilizada como sinal analítico, **Figura 35A**.

Figura 35. (A) DPVs (com correção da linha de base) da de 3-NO₂-Tyr 20,0, 40,0, 60,0, 80,0, 100,0 e 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) Curva analítica da 7-mGuo correspondente, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$



Devido a adsorção dos produtos de oxidação da 3-NO₂-Tyr na superfície do GCE e para assegurar a linearidade da curva analítica do procedimento proposto o GCE foi sempre limpo entre cada medição de DP.

A curva analítica obtida demonstrou uma excelente linearidade considerando a equação da reta $I_{pa} \text{ (A)} = 4 \times 10^{-9} (\pm 1 \times 10^{-10}) [3\text{-NO}_2\text{-Tyr} / \mu\text{mol L}^{-1}] - 1 \times 10^{-7} (\pm 1.85 \times 10^{-8})$, com coeficiente de correlação 0,996, **Figura 35B**. O limite de detecção calculado foi de 6,21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (3 σ / S, onde σ é o desvio padrão dos sinais obtidos através de 10 varreduras em branco e S da sensibilidade) e o limite de quantificação foi de 20,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (10 σ / S).

5.3.4.1 Redução

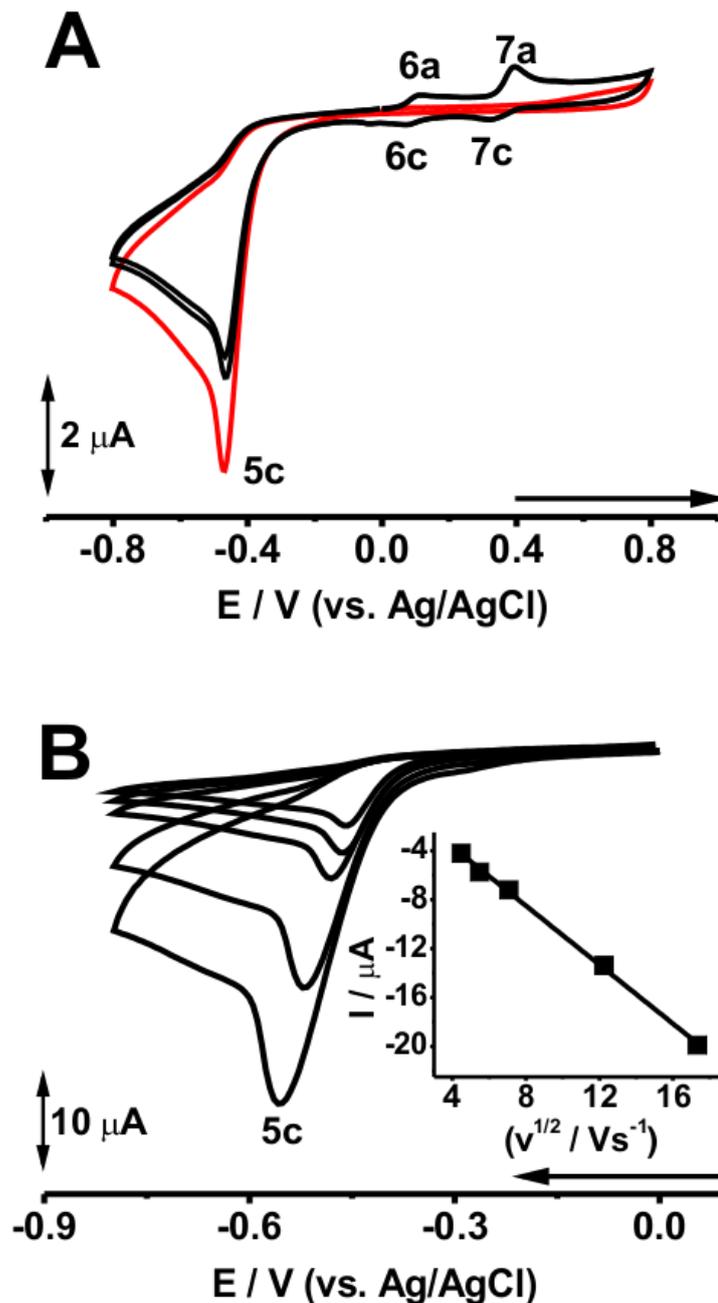
Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados da investigação do comportamento catódico da 3-NO₂-Tyr, em meio aquoso, no GCE, utilizando as técnicas eletroquímicas de CV, SWV e DPV. Um mecanismo para a redução da 3-NO₂-Tyr é proposto.

5.3.4.1.1 Voltametria Cíclica

Os CV foram realizados na faixa de potencial de -0,0 V a $\pm 1,0$ V, em soluções saturadas de N₂, em 0,1 mol L⁻¹ de tampão acetato (pH = 4,5), em uma solução 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 3-NO₂-Tyr. Observa-se nos resultados, que na primeira varredura, a redução da 3-NO₂-Tyr apresenta um único pico catódico irreversível 5c, a $E_{p5c} \pm 0,47$ V, **Figura 36A**, evento esse associado à eletrorredução de o grupo nitro para hidroxilamina e amina. A partir da segunda varredura, se evidencia que picos eletro-oxidados reversíveis, 6a/6c e 7a/7c, **Figura 39A**. Esses resultados estão de acordo com os já observados na literatura para redução de nitro compostos (CARLOS et al., 2013; CLAYDEN et al., 2000; JIANG et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2019), **Figura 36B**. A influência da velocidade de varredura na corrente de eletro-redução de 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 3-NO₂-Tyr também foram investigados por CV, na faixa de 20 a 300 mV s⁻¹. Os resultados do CV mostraram que, aumentando a velocidade, o potencial do pico 5c foi deslocado para valores mais negativos, enquanto a corrente aumentou, **Figura 36B**. As correntes de pico 5c de

3-NO₂-Tyr têm uma relação linear com a raiz quadrada da taxa de varredura, **Figura 36B**, indicando um transporte de massa controlado por difusão (BARD; FAULKNER, 2001; WANG, 2006)

Figura 36. Voltamogramas cíclicos de 150 μmol L⁻¹ 3-NO₂-Tyr em tampão acetato, pH = 4,4, saturado com N₂. **(A)** Varreduras sucessivas, (—) Primeira varredura, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e **(B)** sob diferentes taxas de varredura (20, 30, 50, 150 e 300 mV s⁻¹).



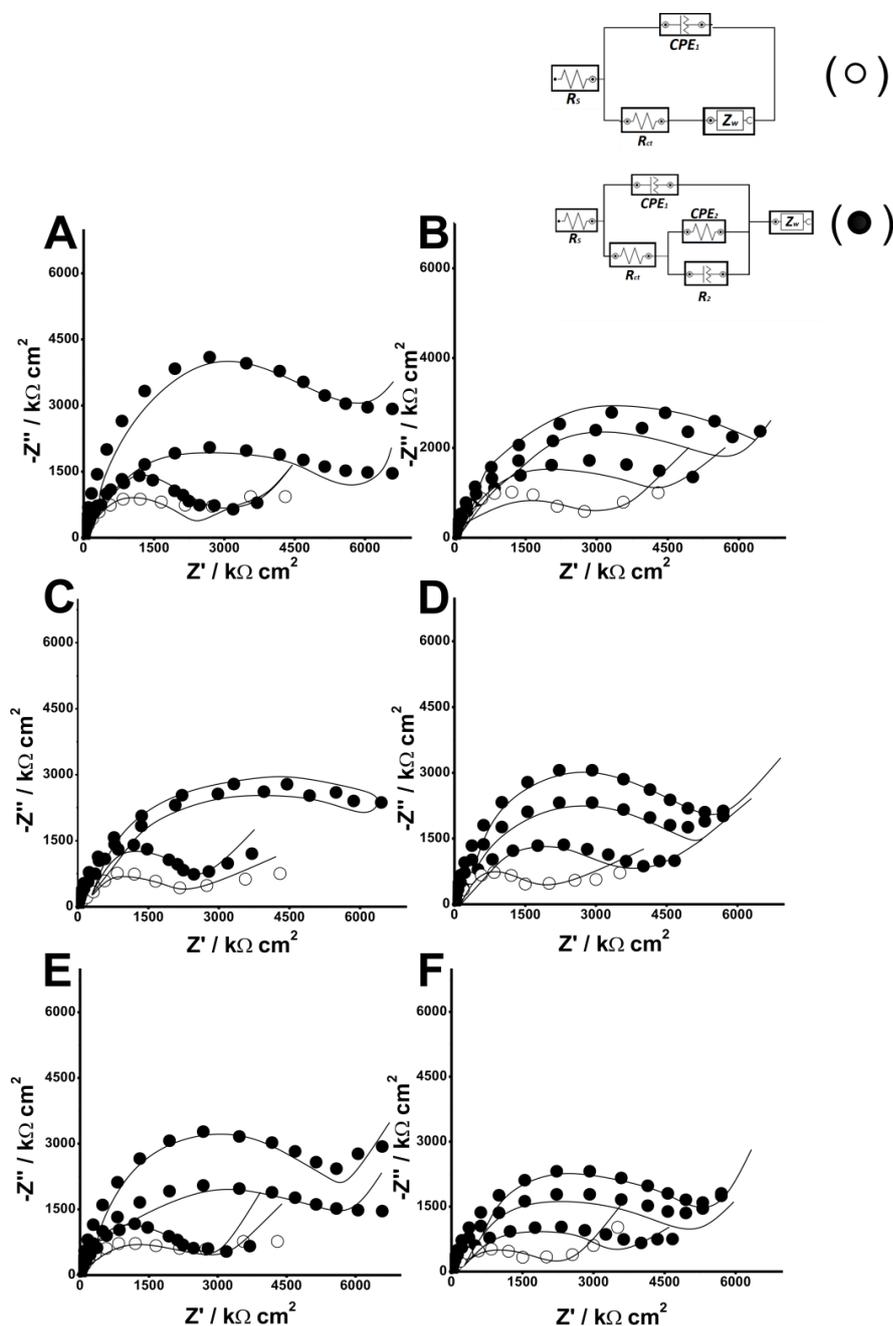
5.4 Estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica do mecanismo de oxidação de *p*-tirosina, *o*-tirosina e 3-nitro-tirosina

O mecanismo de oxidação de *p*-Tyr, *o*-Tyr, e 3-NO₂-Tyr foi investigado pelas técnicas voltamétricas nas seções 5.1, 5.2 e 5.3 na sua maioria é dependente do pH e o processo de transferência de elétrons, provavelmente, ocorre com a formação de produtos de oxidação muito fortemente adsorvidos na superfície do eletrodo. Conseqüentemente, o objetivo deste tópico é estudar pela EIS a adsorção destas tirosinas e seus produtos de oxidação na superfície do GCE, fortalecendo a proposta dos mecanismos de oxidação apresentados nos **Esquemas 2 e 3**.

A oxidação da solução de *p*-Try 100 μmol L⁻¹ foi investigada por EIS, em acetato tampão (pH = 4,5) e tampão fosfato (pH = 7,0), **Figuras 37A e 37B**. Os espectros de impedância eletroquímica sucessivos da *p*-Tyr em pH = 4,5 foram registrados em + 0,85 V, **Figura 37A**, adotando com base os resultados de DPV nas mesmas condições experimentais. Observa-se a formação de um espectro de EI com um semicírculo em altas frequências, considerando a reação de transferência de carga, e em baixas frequências, uma linha reta, mostrando um processo de oxidação controlado por difusão. Além disso, pode-se notar que o tamanho do semicírculo dos respectivos espectros registrados aumentou com as varreduras sucessivas. Quantitativamente, essa elevação evidencia que os valores da **R_{ct}** estão aumentando, confirmando a formação de um filme resistivo na superfície do eletrodo a medida que ocorre a eletroxidação da *p*-Try. Esses resultados estão de acordo com os já observados por CV, DPV e SWV.

A resistência de transferência de carga (**R_{ct}**) e os valores do elemento de fase constante (**CPE**) foram determinados pelo ajuste de todos os espectros com o modelo de circuito equivalente como pode ser observado na **Tabela 5**. Em tampão fosfato, os espectros de EIS sucessivos para a mesma concentração de *p*-Tyr, **Figura 37B**, foram obtidos aplicando um valor potencial de + 0,65 V e o primeiro espectro registrado apresentou um semicírculo a altas frequências e uma linha reta a baixas frequências, ao passo que a partir do segundo, apenas o semicírculo é observado. Os valores de **R_{ct}**, **Tabela 5**, como esperado, aumentam com número de espectros registrados, mostrando que os produtos de oxidação *p*-Try são fortemente adsorvidos na GCE, dificultando os novos processos de transferência de carga.

Figura 37. Espectros de impedância no plano complexo em diferentes potenciais aplicados para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A e B) *p*-Tyr, (C e D) *o*-Tyr e (E e F) 3-NO₂-Tyr. Espectros de impedância consecutivos em (A) + 0,83 V, (B) + 0,68 V, (C) + 0,77 V, (D) + 0,66 V, (E) + 0,94 V e (F) + 0,86 V. (A, C e E) em tampão acetato, pH = 4,4 e (A, C e E) em tampão fosfato, pH = 7,2. (○) Primeira varredura.



Os experimentos foram repetidos para soluções de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ *o*-Tyr e 3-NO₂-Tyr preparadas em tampão acetato (pH = 4,5) ou em tampão fosfato (pH = 7,0). Os EIS de *o*-Tyr, bem como de 3-NO₂-Tyr apresentados nas **Figuras 37E-F**, são semelhantes aos observado para a *p*-Tyr, em geral, em altas frequências, apresentaram semicírculos e em baixa frequência uma linha reta, demonstrando que

os processos anódicos são limitados pela difusão, de acordo com os resultados da CV. Além do que, para ambas as espécies os valores de R_{ct} aumentaram com o número de varreduras, **Tabela 5**, confirmando que os produtos de oxidação *o*-Tyr e 3-NO₂-Tyr também adsorvem e bloqueiam a superfície do GCE. Estes resultados do EIE contribuiriam significativamente para o mecanismo de oxidação da *o*-Tyr proposto, bem como para o comportamento anódico de *p*-Tyr e 3-NO₂-Tyr, uma vez que, eles mostraram que os produtos de oxidação dessas espécies adsorvem na superfície do GCE formando uma monocamada não compacta.

Tabela 5. Dados de impedância em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,5 e em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,2.

| p-Tirosina | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| 1ª Varredura | | 2ª Varredura | | 3ª Varredura | | 4ª Varredura | | |
| pH | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) |
| 4.5 | 540.32 | 1.346 | 835.23 | 1.203 | 1007.32 | 703.21 | 1423.78 | 523.34 |
| 7.2 | 703.24 | 1.429 | 973.88 | 984.39 | 1539.22 | 1.238 | 1642.64 | 1086.32 |
| o-Tirosina | | | | | | | | |
| 1ª Varredura | | 2ª Varredura | | 3ª Varredura | | 4ª Varredura | | |
| pH | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) |
| 4.5 | 413.87 | 1.102 | 557.21 | 100.23 | 1010.52 | 830.32 | 1027.67 | 743.59 |
| 7.2 | 422.38 | 980.32 | 913.17 | 107.42 | 1034.76 | 846.12 | 1121.96 | 678.42 |
| 3-NO ₂ -Tirosina | | | | | | | | |
| 1ª Varredura | | 2ª Varredura | | 3ª Varredura | | 4ª Varredura | | |
| pH | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) | R_{ct} (kΩ cm ⁻²) | CPE (μF cm ⁻² s ⁿ⁻¹) |
| 4.5 | 465.78 | 1000.56 | 660.23 | 1017.52 | 1012.65 | 715.21 | 1045.92 | 562.93 |
| 7.2 | 452.67 | 1035.54 | 789.81 | 1098.32 | 1113.78 | 1.270 | 1510.48 | 682.17 |

CONCLUSÕES

Os resultados eletroquímicos para os biomarcadores de doenças humanas, 7-mGuo, *o*-Tyr e 3-NO₂-Tyr, demonstraram claramente que todas essas espécies são eletroativas no GCE, e portanto, passíveis de sofrerem oxidações e/ou reduções *in-vivo*. Os respectivos mecanismos de oxidação/redução foram postulados e métodos eletroanalíticos para suas quantificações foram desenvolvidos e propostos.

O mecanismo de oxidação de 7-mGuo em meio aquoso foi investigado usando GCE. As técnicas CV e DPV mostraram que a oxidação de 7-mGuo ocorre irreversivelmente em uma única etapa de reação dependente de pH e controlada predominantemente por difusão. As experiências de CV, DPV e EIS demonstraram que os produtos da oxidação da 7-mGuo são adsorvidos na superfície do GCE, causando um aumento na resistência de transferência de carga e uma diminuição na sua corrente de oxidação. Assim, com base nos resultados eletroquímicos, a reação de oxidação de 7-mGuo foi associada com a transferência de um elétron e um próton, produzindo um intermediário altamente reativo, 7-mGuo[•], e produtos poliméricos, que adsorvem fortemente na superfície do GCE. .

Um método eletroanalítico foi desenvolvido para a quantificação da 7-mGuo por DPV usando um GCE, com um limite de detecção de 3,26 µM e quantificação de 10,88 µM. Nenhuma interferência da Gua, Guo e 7-mGua foi verificada, uma vez que a oxidação de 7-mGua ocorre em um potencial bem distinto.

A investigação do comportamento anódico de *p*-Tyr e *o*-Tyr, na GCE, em diferentes meios, mostrou que ambas as moléculas sofrem, em geral, oxidação irreversível em uma etapa dependente do pH, associada à oxidação do grupo fenólico ao radical Tyr[•]. No entanto, os resultados voltamétricos e de EIS demonstraram que o radical *p*-Tyr[•] reage formando produtos poliméricos predominantemente não eletroativos, enquanto o radical *o*-Tyr[•] reage predominantemente com água para formar derivados de *o*- e *p*-quinona. Demonstrando que uma simples mudança de posição do grupo fenólico no anel da tirosina influencia significativamente suas propriedades redox.

A oxidação de 3-NO₂-Tyr, na GCE, ocorreu em duas etapas sucessivas e irreversíveis, o primeiro processo foi associado à eletro-oxidação do grupo fenólico,

para formar o radical 3-NO₂-Tyr[•], que, no segundo processo, foi oxidado a um produto catiônico. Além disso, foi demonstrado que o radical 3-NO₂-Tyr também pode polimerizar, formando produtos não eletroativos que adsorvem fortemente na superfície do GCE da mesma forma que o mecanismo de oxidação proposto para o p-Tyr. Além disso, foi determinado que o grupo nitro ligado ao anel da tirosina dificulta consideravelmente a oxidação do grupo fenólico, uma vez que todos os potenciais anódicos do 3-NO₂-Tyr foram transferidos para valores mais positivos quando comparados aos valores das espécies p-Tyr e o-Tyr.

A 3-NO₂-Tyr sofre eletro-redução no GCE em meio ácido em uma única etapa irreversível, com a formação de dois produtos que são oxidados reversivelmente. Esses processos redox foram associados, como esperado, à eletro-redução do grupo nitro à hidroxilamina e amina, respectivamente.

Um método eletroanalítico foi desenvolvido para a detecção e quantificação da 3-NO₂-Tyr em meio fisiológico (pH = 7,2) por DPV usando um GCE. A curva analítica demonstrou uma excelente linearidade com um coeficiente de correção 0,996, limite de detecção de 6,21 μmol L⁻¹ e o limite de quantificação de 20,49 μmol L⁻¹.



REFERÊNCIAS

- AHSAN, Haseeb. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. **Human Immunology**, [s. l.], v. 74, n. 10, p. 1392–1399, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.06.009>>
- ARDAKANI, M. M. et al. Electrocatalytic oxidation of cysteine by quinizarine at glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 763–768, 2007.
- ATKINS, P.; LORETTA, J. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2001.
- BERNALTE, Elena; CARROLL, Michael; BANKS, Craig E. New electrochemical approach for the measurement of oxidative DNA damage: Voltammetric determination of 8-oxoguanine at screen-printed graphite electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 247, p. 896–902, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400517304628>>
- BEYNON, R.; EASTERBY, J. **The basics buffer Solutions**. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- BLOUNT, B. C. Trace quantitation of the oxidative damage products, meta- and ortho-tyrosine, in biological samples by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v.

244, p. 270–276, 1997.

BRABEC, V.; MORNSTEIN, V. Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes: II. Electrooxidation of amino acids. **Biophysical chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 159–165, 1980. a.

BRABEC, V.; MORNSTEIN, V. Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, [s. l.], v. 625, n. 1, p. 43–50, 1980. b.

BRABEC, V.; SCHINDLEROVA, I. Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes: Part III. The effect of protein adsorption. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, [s. l.], v. 128, p. 451–458, 1981.

BRETT, C. M. A. OLIVEIRA-BRETT, A. M. **Electrochemistry: Principles, Methods and Applications**. [s.l: s.n.].

BRETT, A. M. Oliveira; PIEDADE, J. A. P.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical Oxidation of 8-Oxoguanine. [s. l.], p. 969–973, 2000.

BROTONS, A. et al. Carbon materials for the electrooxidation of nucleobases, nucleosides and nucleotides toward cytosine methylation detection: a review. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 8, p. 702–715, 2016. a.

BROTONS, Ariadna et al. Voltammetric Behaviour of 7-Methylguanine Using Screen-printed Graphite Electrodes: Towards a Guanine Methylation Electrochemical Sensor. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 2766–2772, 2015. a.

BROTONS, Ariadna; M FELIU, Juan. On the Specific Adsorption of 7-methylguanine on Au(111) Surfaces for the Electroanalytical Sensing of Methylation Levels. **Insights in Analytical Electrochemistry**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–7, 2015. b.



Disponível em: <<http://electroanalytical.imedpub.com/on-the-specific-adsorption-of7methylguanine-on-au111-surfacesfor-the-electroanalytical-sensing-ofmethylation-levels.php?aid=7640>>

C. LOPES, Ilanna; OLIVEIRA, S. Carlos B.; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. In situ electrochemical evaluation of anticancer drug temozolomide and its metabolites-DNA interaction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 405, n. 11, p. 3783–3790, 2013.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 6^a ed. São Paulo.

CAO, Fei et al. A high-performance electrochemical sensor for biologically meaningful L-cysteine based on a new nanostructured L-cysteine electrocatalyst. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1019, p. 103–110, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.048>>

CAO, G.; CUTLER, R. G. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4- dinitrophenylhydrazine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 320, p. 106–114, 1995.

CARLOS, Severino et al. Isatin nitro-derivatives redox behaviour. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 689, p. 207–215, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.10.018>>

CHIORCEA-PAQUIM, Ana Maria et al. **Applications of DNA-Electrochemical Biosensors in Cancer Research**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2017. v. 77 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2017.06.003>>

CLAYDEN, Jonathan et al. **Organic Chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

COSTIN, J. W.; FRANCIS, P. S.; LEWIS, S. W. Selective determination of amino

- acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 480, n. 1, p. 67–77, 2003.
- CROW, J. P.; BECKMAN, J. S. Quantitation of Protein Tyrosine, 3-Nitrotyrosine, and 3-Aminotyrosine Utilizing HPLC and Intrinsic Ultraviolet Absorbance. **Methods**, v. 7, p. 116-120, 1995.
- DEGAN, Paolo; MONTESANO, Ruggero; WILD, Christopher P. Antibodies against 7-Methyldeoxyguanosine: Its Detection in Rat Peripheral Blood Lymphocyte DNA and Potential Applications to Molecular Epidemiology. **Cancer Research**. [s. l.], v. 48, p. 5065–5070, 1988.
- DENG, Chunyan et al. Biosensors and Bioelectronics Electrochemical oxidation of purine and pyrimidine bases based on the boron-doped nanotubes modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 469–474, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.11.018>>
- DO NASCIMENTO, R. F. et al. Electrochemical detection of 7-methylguanosine and DNA-methylation. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 10, p. 4525–4534, 2018.
- DU, Ming et al. Simultaneous determination of 3-nitro tyrosine, o-, m-, and p-tyrosine in urine samples by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection with pre-column cloud point extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 803, n. 2, p. 321–329, 2004.
- EDA, Hayriye; KARA, Satana. Bioelectrochemistry Redox mechanism of anticancer drug idarubicin and in-situ evaluation of interaction with DNA using an electrochemical biosensor. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 99, p. 17–23, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.06.002>>
- ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A

- (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 89, p. 11–18, 2013.
- ENACHE, Teodor Adrian; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. Phenol and para - substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 655, n. 1, p. 9–16, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>>
- ENROTH, Christel et al. Detection of internal N7-methylguanosine (m⁷G) RNA modifications by mutational profiling sequencing. **Nucleic Acids Research**. [s. l.], v. 47, n. 20, 2019.
- FASMAN, G. D.; COMPANY, C. R. **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. [s.l.] : CRC Press, 1977.
- FRANCIS, Naila et al. Metilação de DNA e Câncer. [s. l.], v. 56, n. 4, p. 493–499, 2010.
- GUIDELLI, Rolando et al. Defining the transfer coefficient in electrochemistry: An assessment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 245–258, 2014. a.
- GUIDELLI, Rolando et al. Definition of the transfer coefficient in electrochemistry (IUPAC Recommendations 2014). **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 259–262, 2014. b.
- HALLIWELL, Barry; KAUR, Harparkarsh. Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: a cautionary note revisited for the third time. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 27, p. 239–244, 1997.
- HARVEY, R. A.; FERREIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2012.
- HEINECKE, J. W. et al. Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope

dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 300, p. 124–144, 1999.

HENSLEY, K. et al. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 20, p. 8126–8132, 1998. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9763459&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/BF3E00E1-BAE2-43E7-91E1-ED6DAA43B96C>>

HENSLEY, K. et al. Determination of biological oxidative stress using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). **Journal of high resolution chromatography**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 429–437, 1999.

HENSLEY, K.; WILLIAMSON, K. S.; FLOYD, R. A. Measurement of 3-nitrotyrosine and 5-nitro- γ -tocopherol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 520–528, 2000.

HOOSHMAND, Sara; ES'HAGHI, Zarrin. Simultaneous quantification of arginine, alanine, methionine and cysteine amino acids in supplements using a novel bioelectro-nanosensor based on CdSe quantum dot/modified carbon nanotube hollow fiber pencil graphite electrode via Taguchi method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 146, p. 226–235, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.034>>

HWANG, Sun-Gu et al. Study of 7-Methylguanine on pK a Values by Using Density

- Functional Theoretical Method. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 168–170, 2010. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=JCGMCS&py=2010&vnc=v31n1&sp=168>>
- IPSON, Brett R.; FISHER, Alfred L. Roles of the tyrosine isomers meta- tyrosine and ortho- tyrosine in oxidative stress. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 27, p. 93–107, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.005>>
- ISHII, Y. et al. Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 1325–1331, 2006.
- JIANG, Yi et al. Chemosphere Effect of nitro substituent on electrochemical oxidation of phenols at boron-doped diamond anodes. **Chemosphere**, [s. l.], v. 78, n. 9, p. 1093–1099, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.036>>
- KAUR, H.; HALLIWELL, B. Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 233, p. 67–82, 1994.
- KNIGHT, A. R. et al. A high-sensitivity electrochemiluminescence-based ELISA for the measurement of the oxidative stress biomarker, 3-nitrotyrosine, in human blood serum and cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 120, p. 246–254, 2018.
- KRSTULJA, Aleksandra et al. Artificial receptors for the extraction of nucleoside metabolite 7-methylguanosine from aqueous media made by molecular

- imprinting. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1365, p. 12–18, 2014.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.086>>
- LI, M. et al. HPLC and LC–MS studies of hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals generated from Udenfriend's reagent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 312, p. 316–322, 2003.
- LI, Qian; BATCHELOR-MCAULEY, Christopher; COMPTON, Richard G. Electrochemical Oxidation of Guanine : Electrode Reaction Mechanism and Tailoring Carbon Electrode Surfaces To Switch between Adsorptive and Diffusional Responses. **Journal of Physical Chemistry B**. [s. l.], v. 114, p. 7423–7428, 2010.
- LIANG, H. J. et al. Molecularly imprinted electrochemical sensor able to enantioselectively recognize D and L-tyrosine. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 542, n. 1, p. 83–89, 2005.
- MAHAN, B. H. **Química: um curso universitário**. Edgard Bluched ed. São Paulo. 1972.
- MONGAN, Nigel P.; EMES, Richard D.; ARCHER, Nathan. Detection and analysis of RNA methylation. **F1000Research**. [s. l.], v. 8, p. 1–12, 2019.
- NASCIMENTO, Raphael F. et al. Redox reactions of *ortho*-tyrosine and 3-*nitro*-tyrosine : A comparative study with *para*-tyrosine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. [s. l.], v. 854, n. 2, p. 113535, 2019.
- NELSON, David L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2014.
- NIOT-MANSART, Vanessa; MUHAMEDI, Arbana; ARNOULD, Jean-pierre. A competitive ELISA detecting 7-methylguanosine adduct induced by N-nitroso dimethylamine exposure. **Human & Experimental Toxicology** [s. l.], n.

2005, p. 89–94, 2015.

OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria; ANTÔNIO DA SILVA, Luís; BRETT, Christopher M.

A. Adsorption of guanine, guanosine, and adenine at electrodes studied by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance. **Langmuir**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 2326–2330, 2002.

OLIVEIRA, S. C. B. et al. Electrochemical Biosensors for DNA–Drug Interactions. In:

Encyclopedia of Interfacial Chemistry. [s.l: s.n.]. p. 124–139.

OLIVEIRA, S. Carlos B.; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. In situ DNA oxidative

damage by electrochemically generated hydroxyl free radicals on a boron-doped diamond electrode. **Langmuir**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 4896–4901, 2012.

OLIVEIRA, Severino Carlos B.; SANTARINO, Inês B.; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria.

Direct electrochemistry of native and denatured anticancer antibody rituximab at a glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 1029–1034, 2013.

OSTATNÁ, V.; ČERNOCKÁ, H.; PALEČEK, E. Simple protein structure-sensitive

chronopotentiometric analysis with dithiothreitol-modified Hg electrodes. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 87, p. 84–88, 2012.

PAL, H. et al. The fluorescence lifetimes of isomeric tyrosines. **Chemical physics**

letters, [s. l.], v. 152, n. 1–2, p. 75–78, 1988.

PARK, Jeen-woo; AMES, Bruce N. 7-Methylguanine adducts in DNA are normally

present at high levels and increase on aging: Analysis by HPLC with electrochemical detection. **Biochemistry**. [s. l.], v. 85, n. October, p. 7467–7470, 1988.

PENNATHUR, Subramaniam et al. Mass Spectrometric Quantification of 3-



- Nitrotyrosine , ortho-Tyrosine , and o-Dityrosine in Brain Tissue of a Model of Oxidative Stress in Parkinson's Disease*. **The Journal of Biological Chemistry**. [s. l.], v. 274, n. 49, p. 34621–34628, 1999.
- QUEIROZ, Nathalia L. et al. Electrochemistry Study of Antineoplastic Raltitrexed Oxidation Mechanism and its Interaction with DNA. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 1184–1191, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201800087>>
- RAFIQUE, Bushra et al. Biosensors and Bioelectronics Interaction of anticancer drug methotrexate with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. **Biosensors and Bioelectronic**, [s. l.], v. 44, p. 21–26, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.028>>
- RAVIDRAN, G.; BRYDEN, W. L. Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 309–314, 2005.
- REDDY, S. et al. The use of phenylalanine to detect hydroxyl radical production in vivo: a cautionary note. **Free Radical Biology & Medicine**, [s. l.], v. 27, p. 1465, 1999.
- REYNAUD, C. et al. Monitoring of urinary excretion of modified nucleosides in cancer patients using a set of six monoclonal antibodies [published erratum appears in Cancer Lett 1992 Mar 31;63(1):81]. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 255–262, 1992.
- REYNAUD, J. A.; MALFOY, B. Electrochemical investigation of amino acids at solid electrodes - Part I. Sulfur components: cystine, cysteine, methionine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 114, p. 195–211, 1980.
- SALMAN-TABCHEH, S.; GUÉRIN, M. C.; TORREILLES, J. Nitration of tyrosyl-

residues from extra-and intracellular proteins in human whole blood. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 695–698, 1995.

SANJUÁN, Ignacio et al. Boron-doped diamond electrodes explored for the electroanalytical detection of 7-methylguanine and applied for its sensing within urine samples. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 197, p. 167–178, 2016.

a.

SANJUÁN, Ignacio et al. Boron-doped diamond electrodes explored for the electroanalytical detection of 7-methylguanine and applied for its sensing within urine samples. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 197, p. 167–178, 2016.

b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.11.026>>

SANTARINO, Inês B.; OLIVEIRA, Severino Carlos B.; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. In Situ Evaluation of the Anticancer Antibody Rituximab-dsDNA Interaction Using a DNA-Electrochemical Biosensor. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 1304–1311, 2014.

SARVER, Aaron et al. Nitrotyrosine by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. **Journal of American Society for Mass Spectrometry** [s. l.], v. 0305, n. 01, p. 439-448, 2001.

SEELEY, Kent W. et al. Evaluation of a Method for Nitrotyrosine Site Identification and Relative Quantitation Using a Stable Isotope-Labeled Nitrated Spike-In Standard and High Resolution Fourier Transform MS and MS / MS Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**. [s. l.], v. 15, p. 6265–6285, 2014.

SEQUARIS, J. M. et al. Electrochemical investigation of nucleic acid behaviour. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. [s. l.], v. 77, p. 67–72, 1977.

SEQUARIS, J. M.; REYNAUD, J. A. Polarographic investigations of 7-

- methylguanosine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 207–219, 1975.
- SHEN, L.; HUANG, R.; HU, N. Myoglobin in polyacrylamide hydrogel films: direct electrochemistry and electrochemical catalysis. **Talanta**, [s. l.], v. 56, p. 1131–1139, 2002.
- SHIMIZU, Kenichi; SEPUNARU, Lior; COMPTON, Richard G. Innovative catalyst design for the oxygen reduction reaction for fuel cells. **Chem. Sci.**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 3364–3369, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SC00139D>>
- SIKORSKA, E. et al. Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 613, n. 2, p. 207–217, 2008.
- SONG, Boya et al. Voltammetric microwell array for oxidized guanosine in intact ds-DNA. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 85, n. 22, p. 11061–11067, 2013.
- STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino acids**, [s. l.], v. 25, p. 207–218, 2003.
- STILLWELL, W. G. et al. Urinary Excretion of Nitrate, TV-Nitrosoproline, 3-Methyladenine, 7-Methylguanine in a Colombian Population at High Risk for Stomach Cancer¹ and. **Cancer Research**. [s. l.], v. 51, p. 190–194, 1991.
- SVOBODA, Peter; KASAI, Hiroshi. Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents. **Analytical Biochemistry**. [s. l.], v. 334, p. 239–250, 2004.
- TEIXEIRA, Dulce et al. 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. **Biochimie**, [s. l.], v. 125, p. 1–11, 2016.



- THOMAS, Beena et al. A novel method for detecting 7-methyl guanine reveals aberrant methylation levels in Huntington disease. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 436, n. 2, p. 112–120, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.035>>
- TOPKAYA, Seda Nur et al. Nitration of tyrosine and its effect on DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 102, n. November 2017, p. 464–469, 2018.
- UNDERBERG, W. J. M.; WATER, J. C. M. Derivatization trends in capillary electrophoresis: An update. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 23, p. 3922–3933, 2002.
- WANG, Joseph. **Analytical Electrochemistry**. 3^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- WANG, Po et al. Biosensors and Bioelectronics Simultaneous detection of guanine , adenine , thymine and cytosine at choline monolayer supported multiwalled carbon nanotubes film. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 3339–3345, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.011>>
- YOU, J. et al. Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 2-(9-carbazole)-ethyl chloroformate by reverse phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 313, p. 17–27, 2003.
- ZHAN, X.; WANG, X.; DESIDERIO, D. M. Mass spectrometry analysis of nitrotyrosine-containing proteins. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 423–448, 2015.
- ZHANG, H. et al. Ultrasensitive assays for proteins. **Analyst**, [s. l.], v. 132, n. 8, p.

734–737, 2007.

ZHOU, M. et al. Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 79, n. 14, p. 5328–5335, 2007.

ZHOU, Yuyang et al. Highly selective Electrochemiluminescent probe to histidine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 799, n. April, p. 122–125, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.05.054>>



ANEXOS



Produção

Artigos

1. **Raphael F. Nascimento**, José A. M. Nascimento, João G.S. Montenegro. V. B. Nascimento and Severino Carlos. B. Oliveira. ***Electrochemical Detection of 7-Methylguanosine and DNA-Methylation***. ANALYTICAL METHODS. v. 10, p. 4525, 2018.
2. **Raphael F. Nascimento**, Maysa Nascimento, José Nascimento. Hitala Santos, Alex Araújo and Severino Carlos. B. Oliveira. ***Redox reactions of ortho-tyrosine and 3-nitro-tyrosine: a comparative study with para-tyrosine***. JOURNAL OF THE ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY. v. 854, p. 113535, 2019.
3. LOURENCO, A. S.; **Nascimento, R.F.**; SILVA, A. C.; RIBEIRO, W. F.; ARAUJO, M. C. U. ; OLIVEIRA, S. C. B.; Nascimento, V. B. ***Voltammetric determination of tartaric acid in wines by electrocatalytic oxidation on a cobalt(II)-phthalocyanine-modified electrode associated with multiway calibration***. ANALYTICA CHIMICA ACTA, v. 1008, p. 29, 2018.

Comunicações em Congresso

- 1- OLIVEIRA, S. C. B.; **do Nascimento, R.F.**; QUEIROZ, N. L. ; Montenegro, J. G. ; Nascimento, V. B.. ***Detection of guanine-methylation using a DNA-electrochemical biosensor***. In: XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019, São Carlos. XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019.
- 2- NASCIMENTO, M. L. ;**do Nascimento, R.F.**; ARAUJO, A. P. ; NASCIMENTO, J. A. M. ; Nascimento, V. B.; OLIVEIRA, S. C. B. . ***Mecanismo redox da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo***. In: XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019, São Carlos. Mecanismo redox da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo.
- 3- NASCIMENTO, M. L.; **do Nascimento, R.F.**; ARAUJO, A. P.; NASCIMENTO, J. A. M.; Nascimento, V. B.; OLIVEIRA, S. C. B. Mecanismo redox da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo. In: XXII Simpósio Brasileiro de

- Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019, São Carlos. **Mecanismo redox da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo, 2019.**
- 4- **do Nascimento, R.F.**; NASCIMENTO, J. A. M.; Montenegro, J. G.; Nascimento, V. B.; OLIVEIRA, S. C. B. ***Electrochemical detection of DNA methylation using a DNA-Electrochemical Biosensor.*** In: 69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2018, Bologna. **69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2018.**
- 5- OLIVEIRA, S. C. B.; **do Nascimento, R.F.**; QUEIROZ, N. L.; Montenegro, J. G.; Nascimento, V. B.. ***Detection of guanine-methylation using a DNA-electrochemical biosensor.*** In: **XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019, São Carlos.**
- 6- **Nascimento, R.F.**; NASCIMENTO, J. A. M.; DO NASCIMENTO, VALBERES B. ; OLIVEIRA, S. C. B. . ***Electrochemical detection of 7-methylguanosine at glassy carbon electrode.*** In: XXI Simpósio de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, Natal. **XXI Simpósio de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.**
- 7- Lima, I. A. F. S.; Andrade, T. B. M.; **Nascimento, R.F.**; OLIVEIRA, S. C. B. ;Nascimento, V. B. ***Preparação eletrolítica e caracterização eletroquímica de nanopartículas de carbono modificadas com ABTS.*** In: XXI Simpósio de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, Natal. **XXI Simpósio de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.**
- 8- LOURENCO, A. S.; **Nascimento, R.F.**; RIBEIRO, W. F.; OLIVEIRA, S. C. B. ;Nascimento, V. B. ***Determinação voltamétrica de fármacos via oxidação eletrocatalítica do contra-íon tartarato em eletrodo modificado com ftalocianina de cobalto (II).*** In: XXI Simpósio de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.
- 9- LOURENCO, A. S.; **Nascimento, R.F.**; RIBEIRO, W. F.; OLIVEIRA, S. C. B.; Nascimento, V. B.. ***Determinação indireta de metoprolol utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II).*** In: XVIII Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, 2016